

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. A. Kröncke

Chromatographische Untersuchungen von niedermolekularen organischen Speichelbestandteilen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Beate Pfannerer
aus Nürnberg

1984

1984 № 230



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546208_0114

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. A. Kröncke

Chromatographische Untersuchungen von niedermolekularen organischen Speichelbestandteilen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Beate Pfannerer
aus Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Chromatographische Untersuchungen
von niedermolekularen
organischen Speichelinbestandteilen

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf
Referent: Prof. Dr. A. Kröncke

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.1984

Für Hermine

I n h a l t

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Material und Methoden	4
1. Aufbereitung der zu chromatographieren- den Substanzen	4
1.1. Speichelgewinnung und -verarbeitung	4
1.2. Vergleichssubstanzen	5
2. Dünnschichtchromatographie	6
2.1. Vorbereitung der Platten, Aufgeben der Proben	6
2.2. Entwicklung	7
2.3. Nachweismethoden	10
2.3.1. Ultraviolette Licht	10
2.3.2. Modifiziertes Ninhydrinreagens	11
2.3.3. Chlor-Tolidin-Reaktion	12
2.3.4. E h r l i c h' Reagens	13
2.4. Qualitative Auswertung und Dokumenta- tion	13
3. Zuordnung von dünn- und gelochromatographi- scher und gelochromatographischer Spei- cheltrennung	14
3.1. Gelchromatographie	14
3.1.1. Trennbedingungen	14
3.1.2. Versuchsanordnung und -durchführung	15
3.2. Dünnschichtchromatographie der gewonne- nen Fraktionen	16
III. Ergebnisse	17
1. Dünnschichtchromatographie	17

1.1.	Enteiweißer Speichel	17
1.1.1.	Eindimensionale Trennung	17
1.1.2.	Zweidimensionale Trennung	26
1.2.	Vergleichssubstanzen	29
2.	Zuordnung von dünn-schichtchromatographischer und gelchromatographischer Speicheltrennung	32
2.1.	Gelchromatographie	32
2.2.	Dünnschichtchromatographie der gewonnenen Fraktionen	33
IV.	Diskussion	44
1.	Dünnschichtchromatographie	44
1.1.	Experimentelles Vorgehen	45
1.2.	Dünnschichtchromatographie von enteiweißtem Speichel	47
1.2.1.	Eindimensionale Dünnschichtchromatographie	47
1.2.2.	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	53
1.3.	Vergleichssubstanzen	54
2.	Zuordnung von dünn-schichtchromatographischer und gelchromatographischer Speicheltrennung	55
2.1.	Experimentelles Vorgehen	55
2.2.	Gelchromatographische Speicheltrennung	56
2.3.	Dünnschichtchromatographie des fraktionierten Speichels	57
3.	Stellung der Dünnschichtchromatographie in der Speicheltrennung	59
V.	Zusammenfassung	60
VI.	Literaturverzeichnis	62

I. Einleitung und Problemstellung

Im Jahr 1955 betonte M ü h l e m a n n die seit Anfang dieses Jahrhunderts bekannte "protektive Wirkung des Speichels vor Zahnkaries". Seine Menge und sein Gehalt an Puffersystemen und anorganischen Ionen als "lösliche Apatitphase" sind als nicht zu vernachlässigende Faktoren des Kariesgeschehens zu betrachten.

Die biochemische Speichel-Kariesforschung brachte Erkenntnisse über den Einfluß des Speichels auf den Stoffwechsel oraler Mikroorganismen. Von H a r t l e s und W a s d e l l wurden 1955 erste Beobachtungen über einen im Überstand des zentrifugierten Speichels vorhandenen "Faktor" veröffentlicht, der die glykolytische Aktivität von Speichelsediment deutlich steigert. 1957 wurde der Faktor von B r a m s t e d t, K r ö n c k e und N a u j o k s als "aktivierendes Prinzip" wiederentdeckt. Diese Ergebnisse wurden in der Folgezeit von zahlreichen Autoren bestätigt, die sich mit der Wirkungsweise und der Charakterisierung dieses Prinzips beschäftigen (B e c k, B i b b y, 1961; W a s d e l l, 1962; H a r t l e s, 1963; K a w a s a k i, 1964; H a y und H a r t l e s, 1965, 1966; G u g g e n h e i m, 1966; M e l v i l l e und H a r t l e s, 1966; M i s h i r o et al., 1966, 1970; M o l a n und H a r t l e s, 1969, 1972; K i r i m u r a et al., 1970; H o l b r o o k und M o l a n, 1973, 1975; K l e i n b e r g et al., 1973, 1976; D i s t l e r und K r ö n c k e, 1982).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur stofflichen Natur des "aktivierenden Prinzips" sind vielgestaltig und als nicht abgeschlossen zu betrachten. B r a m s t e d t et al. gaben 1957 an, daß es sich um einen wasserlöslichen, hitze-, säure- und alkalistabilen, dialysierbaren, ultrafiltrierbaren Faktor mit Kationencharakter handelt, der

bei Veraschung zerstört wird. Daraus ergab sich, daß sich dahinter weder ein anorganisches Ion noch ein Ferment verbergen konnte. Die geringe Aktivitätsminderung der Speichelprobe bei Ausfällen der hochmolekularen Körper mit Alkohol wies auf niedermolekulare organische Substanzen hin. Die 1958 von K r ö n c k e et al. veröffentlichten Untersuchungen beschäftigten sich mit Peptiden im menschlichen Speichel. Die Autoren isolierten mit papierchromatographischen Methoden vier Peptide, von denen eines in seinen chemischen Eigenschaften und möglicherweise auch in seiner biochemischen Wirkung dem "aktivierenden Prinzip" zugeordnet werden kann. Mit Hilfe der Gelchromatographie über Sephadex G 50 fand K a w a s a k i 1964 eine dem "aktivierenden Prinzip" entsprechende Proteinfraction mit einem Molekulargewicht von 7000 bis 10000. Die Bedeutung einer hochmolekularen Fraction zum Erreichen der vollen Aktivität neben der hauptsächlich aktiven niedermolekularen Fraction des Speichels zeigten H a y und H a r t l e s 1966. Ihre Versuche mit synthetischem Speichel wiesen auf Harnstoff und Glutathion hin. Glutathion war aber im Speichel nicht nachzuweisen und die 1969 von M o l a n und H a r t l e s erfolgte Identifikation von Harnstoff als Bestandteil der aktiven niedermolekularen Fraction wurde 1970 durch Untersuchungen von M i s h i r o et al. widerlegt. H o l b r o o k und M o l a n betonten 1973 die Bedeutung der niedermolekularen Fraction und isolierten zwei Jahre später auf gelchromatographischem Weg über Sephadex G 25 ein vor allem Histidin, Lysin und Arginin enthaltendes basisches Peptid mit einem Molekulargewicht von mindestens 2000 bis 3000. Ein kleines basisches Peptid der Sequenz H-Gly-Gly-Lys-Arg-OH wurde 1976 von K l e i n b e r g, K a n a p k a und C r a w als "pH-rise-factor" isoliert und "Sialin" benannt.

Festzustehen scheint nur, daß entweder niedermolekulare Proteine oder Peptide hauptsächlich für die glykolysesteigernden Eigenschaften des Speichels verantwortlich sind, wie es K r ö n c k e bereits 1958 vermutet hatte. Aminosäurengemische sind zwar in der Lage, Stoffwechselsteigerungen von Mundbakterien hervorzurufen, aber erst weit jenseits der im Speichel vorhandenen Konzentrationen (W a s d e l l, 1962). K i r i m u r a et al. konnten 1970 zeigen, daß kleine Peptide (aus enzymatischer Caseinhydrolyse) eine deutlich größere Stoffwechselsteigerung bei Streptococcus salivarius bewirken als aus Salzsäurehydrolyse von Casein gewonnene Aminosäurengemische.

Während sich die Mehrzahl der oben genannten Autoren der Gelchromatographie mit Gelen auf Dextranbasis (Sephadex) bediente, um eine Trennung in etwa nach dem Molekulargewicht zu erreichen, nahm K r ö n c k e 1958 die Speicheltrennung im Hinblick auf die gesuchten Peptide mit papierchromatographischen Methoden vor, wobei er nicht ausschließt, "daß darüberhinaus noch weitere Peptide im Speichel vorkommen, die mit der gewählten Darstellungsmethode nicht erkannt werden können".

Da die sich erst ab Anfang bis Mitte der 60er Jahre durchsetzende Dünnschichtchromatographie gegenüber der Papierchromatographie in der Aminosäuren- und Peptidtrennung aber entscheidende Vorteile besitzt (B r e n n e r und N i e d e r w i e s e r, 1960), bietet sich diese ohne großen technischen Aufwand durchführbare Methode auch für Untersuchungen auf diesem Gebiet an.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine dünnschichtchromatographische Trennmethode der niedermolekularen ninnhydrinpositiven Bestandteile des zellfreien Speichels im Hinblick auf eine Verwendung bei Untersuchungen zur Natur des "aktivierenden Prinzips" zu erarbeiten und eine Zuordnung zu gelchromatographischen Trennungen herzustellen.

II. Material und Methoden

I. Aufbereitung der zu chromatographierenden Substanzen

1.1. Speichelgewinnung und -verarbeitung

Für die Mehrzahl der Versuche wurde Ruhespeichel eines Probanden gesammelt und zur Abtrennung der zellulären Elemente 45 min. bei 4°C und 3500 U/min zentrifugiert. Der resultierende zellfreie Überstand wurde mit der 3,5fachen Menge Äthanol versetzt, bis die Eiweißkörper deutlich ausfielen und erneut zentrifugiert, bis das hochmolekulare Protein sich gesetzt hatte. Der durch Gefriertrocknen nur schwer entfernbare Alkohol wurde dem Zentrifugat mit einem Vakuum-Rotationsverdampfer (Büchi Rotavapor M) entzogen, anschließend der Rest gefriergetrocknet.

1 ml zellfreier Speichelüberstand ergab etwa 2 mg gefriergetrocknetes enteweißtes Material, das zur Dünnschichtchromatographie in 50%iger Ameisensäure vollständig gelöst wurde; die Konzentration betrug stets 100 mg/ml. Zu den gelchromatographischen Versuchen wurde das Lyophilisat in 0,01 M $\text{NH}_4^+/\text{HCOO}^-$ -Puffer gelöst, wobei die Konzentration 30,8 mg/ml entsprach.

Für die Vorversuche wurde Speichel anderer Herkunft und Verarbeitung verwendet. Das Material entstammte gepooltem Reizspeichel verschiedener Probanden, und wurde nicht mit Alkohol behandelt, sondern 10 min. bei 4°C und 4000 U/min über den Dialysekegel CF 25 der Fa. Amicon GmbH, Witten zentrifugiert. Dabei liegt die Retention von Molekülen mit einem Molekulargewicht über 25.000 nach Angaben des Herstellers bei über 95%.

1.2. Vergleichssubstanzen

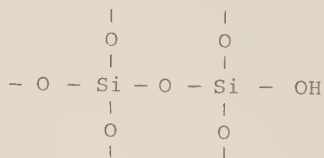
Für vergleichende dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden 19 reine Aminosäuren (Satz Nr. 39001) und das Hexapeptid Leu-Trp-Met-Arg-Phe-Ala-HCOOH (Nr. 51932) der Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg verwendet. Das errechnete Molekulargewicht des Peptids liegt bei 823,1.

Die Aminosäuren wurden in aqua bidest. und das Peptid in 50%iger Ameisensäure jeweils in der Konzentration 1 mg/ml gelöst. Auf DC-Folien wurden jeweils 5 µl, entsprechend 5 µg, aufgetragen.

2. Dünnschichtchromatographie

Bei der Dünnschichtchromatographie werden die zu trennenden Substanzen als begrenzte Zone (Start) auf eine Trennschicht aus feinkörnigem Material aufgebracht. Die Trennung erfolgt durch Kapillarwanderung eines Fließmittels und der für einen bestimmten Stoff unter bestimmten Bedingungen charakteristischen Verzögerung gegenüber der mobilen Phase während des Entwicklungsvorgangs. Je stärker zu trennende Substanzen an das polare Trägermaterial adsorbiert werden, desto geringer ist ihre Wanderungsweite im Vergleich zur Laufmittelfront.

In der vorliegenden Arbeit wurde als stationäre Phase Kieselgel



gewählt.

2.1. Vorbereitung der Platten, Aufgeben der Proben

Hauptsächlich verwendet wurden

DC-Alufolien Kieselgel 60 F 254
Schichtdicke 0,2 mm
Größe 20 x 20 cm
(Merck Art. Nr. 5554),

außerdem für die Vorversuche auch

DC-Alurolle Kieselgel 60 F 254
Schichtdicke 0,2 mm
Höhe 20 cm
(Merck Art. Nr. 5562).

Bei nicht frisch angebrochenen Packungen wurden die DC-Folien vor dem Gebrauch mehrere Stunden lang im Trockenschrank von Feuchtigkeit und Labordämpfen befreit.

Zunächst wurden mit einem weichen Bleistift die Startpunkte und die Frontlinie auf der Schicht markiert. Die Startpunkte befanden sich in 1 cm Abstand zum Unterrand der Folie und mindestens 1 cm voneinander und den seitlichen Plattenbegrenzungen entfernt, der Abstand Fließmittelfront - untere Folienkante betrug stets 18 cm. Die sich damit ergebende Laufstrecke von 17 cm war ein willkürlich festgelegter Wert und wurde bei allen Chromatogrammen eingehalten, da Vorversuche ergeben hatten, daß mit wechselnden Trennstrecken keine reproduzierbaren R_f -Werte erzielbar waren.

Von den Vergleichslösungen der Aminosäuren und des Testpeptids wurden pro Startpunkt 5 µg Substanz aufgetragen, während bei Speichel mit einer Startmenge von 250 µg gearbeitet wurde. Mit einer 5 µl - fassenden Mikrokolbenspritze ("Mikroliter 7005" der Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz) wurde das Aufgeben der Proben auf die DC-Folien vorgenommen. Um die Startpunkte gleichmäßig klein zu halten, wurden unter Zwischentrocknen mit einem Warmluftfön nur jeweils 0,5 µl-Tröpfchen auf die DC-Folie abgesetzt, bis das erforderliche Gesamtvolumen von 2,5 - 5 µl aufgetragen war. Mit dieser Methode betrug der Durchmesser der Startflecke nicht mehr als 2 - 3 mm.

2.2. Entwicklung

Elutionsmittel:

In umfangreichen Vorversuchen wurden verschiedene in der Literatur zur Trennung von Aminosäuren bzw. Peptiden angegebene Elutionsmittelsysteme sowie Modifikationen ihrer Mischungsverhältnisse auf ihre Eignung zur dünn-schichtchromatographischen Trennung von Speichel überprüft. Eine Übersicht über die getesteten Gemische gibt Tab. 1.

Laufmittelsysteme	Mischungsverhältnis (v/v)
Methanol - 25% NH_3	60 : 40
Äthanol - 25% NH_3	40 : 40 60 : 40 80 : 40
n-Propanol - 25% NH_3	60 : 40
n-Butanol - 25% NH_3	60 : 40
n-Butanol - 3% NH_3	50 : 22
n-Pentanol - 25% NH_3 - Methanol	60 : 40 : 30
n-Butanol - Essigsäure - Wasser	40 : 15 : 10 40 : 30 : 10 40 : 60 : 10
n-Propanol - Wasser	60 : 40
Essigsäureäthylester - Pyridin - - Essigsäure - Wasser	50 : 10 : 10 : 10 20 : 20 : 20 : 20
Cyclohexan - Essigsäureäthylester	50 : 50
Pyridin - Amylalkohol - Wasser	7,5 : 7 : 6
Dioxan - Wasser	90 : 10
Chloroform - Aceton	80 : 20
Phenol - Wasser	7,5 : 2,5 (g/g)
Chloroform - Methanol - 25% NH_3 - - Wasser *)	24 : 24 : 8 : 4 12 : 24 : 8 : 4
Chloroform - Methanol	90 : 10

Tab. 1: Auf ihre Eignung zur Speicheltrennung überprüfte Laufmittelgemische

*) dies entspricht dem von Brenner, Niederwieser, Pataki (1967) angegebenen Gemisch Chloroform - Methanol - 17% NH_3 (40 : 40 : 20)

Aus den in Tab. 1 angegebenen Fließmittelgemischen ergaben sich zwei zur Speicheltrennung besonders geeignete, die deshalb für alle weiteren Versuche verwendet wurden:

1. Chloroform - Methanol - 25% NH_3 - Wasser

24 : 24 : 8 : 4 (v/v)

- Chloroform (Apotheke der Universität)
- Methanol purum (Apotheke der Universität)
- 25% Ammoniak (Merck Art. Nr. 5422)
- aqua bidest.

Der pH-Wert wurde mit einem Universalindikatorstäbchen auf etwa 11 bestimmt.

2. n-Butanol - Essigsäure - Wasser

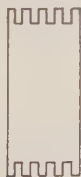
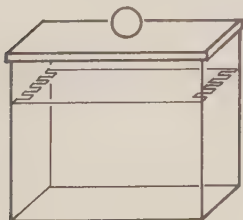
40 : 15 : 10 (v/v)

- n-Butanol (Merck Art. Nr. 988)
- Essigsäure (Merck Art. Nr. 63)
- aqua bidest.

Der pH-Wert dieses Gemisches betrug circa 3.

Trennkammern:

Zur hier durchgeführten aufsteigenden Entwicklung wurden rechteckige Trogkammern aus Glas mit plangeschliffenem Deckel, Maße 21 x 21 x 9 cm, der Fa. Desaga, Heidelberg benutzt. Um mehrere der flexiblen DC-Alufolien auf-



recht in die Kammer stellen zu können, wurden selbstgefertigte Halterahmen aus federhartem, nicht rostendem Stahldraht in den oberen Abschnitt des Troggefäßes geklemmt.

Durchführung der Chromatographie:

Die mit den zu trennenden Proben beschickten DC-Folien wurden mit 60 ml des frisch bereiteten und ausreichend gemischten Elutionsmittels bei "Kammersättigung" entwickelt. Dazu wird das Glasgefäß allseitig mit Filterpapier ausgekleidet und dieses Papier durch Schwenken der Kammer vollständig mit Fließmittel benetzt. Nach S t a h l (1967) ist die Kammersättigung zur Vermeidung von sog. "Randphänomenen" - und damit schlecht reproduzierbaren Ergebnissen - absolut notwendig.

Der ebenfalls von ihm geforderte dichte Verschuß des Entwicklungsgefäßes während des Chromatographiervorgangs konnte durch Aufbringen hochviskösen Silikonfettes auf die Schliffflächen erreicht werden. Anderenfalls würden die Trenneigenschaften des Systems durch die sich ständig ändernde Laufmittelzusammensetzung beeinträchtigt, zumal hier leichtflüchtige Substanzen verwendet wurden. Aus dem gleichen Grund wurden die Kammern während der Entwicklung nicht geöffnet, bis die Laufmittelfront die eingezeichnete Linie erreicht hatte (vgl. S. 7).

Nach Beendigung des Entwicklungsvorgangs wurden die Platten entnommen und so lange im warmen Luftstrom getrocknet, bis der Fließmittelgeruch verfliegen war, um mögliche Beeinträchtigungen der anschließenden Nachweisreaktion bzw. der Entwicklung in der zweiten Dimension durch anhaftendes Elutionsmittel so weit wie möglich zu verhindern.

2.3. Nachweismethoden

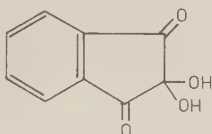
2.3.1. Ultraviolette Licht

Zum Nachweis von fluoreszierenden bzw. UV-Licht absorbierenden Substanzen wurde die Lampe "Original Hanau Fluo-

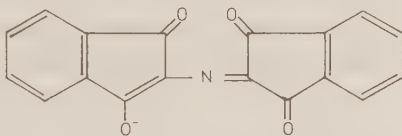
test" (Typ 5301) benutzt. Dieses Gerät ermöglichte ein Auswerten der Chromatogramme bei zwei Wellenlängenbereichen, einem langwelligen um 366 nm und einem kurzwelligen um 254 nm. Dazu war ein völlig abgedunkelter Raum notwendig.

2.3.2. Modifiziertes Ninhydrin-Reagens

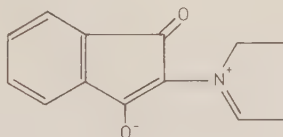
Das seit 70 Jahren gebräuchlichste und bis heute - v.a. wegen seiner hohen Empfindlichkeit - bedeutendste Nachweisreagens zur Detektion von Aminosäuren und niederen Peptiden auf Papier- oder Dünnschichtchromatogrammen ist Ninhydrin (2,2-Dihydroxy-1,3-indandion).



Nach C a l d i n (1960) ergibt Ninhydrin mit NH_2 -Gruppen von Aminosäuren, primären Aminen oder niederen Peptiden einen rot-violetten Farbstoff,



während es mit Prolin bzw. Hydroxyprolin zu einem gelben Produkt reagiert.



In der vorliegenden Arbeit wurde das nach M o f f a t und L y t l e (1959) modifizierte Reagens verwendet, das aus zwei Lösungen besteht, die kurz vor Gebrauch im Verhältnis 50 : 3 zu mischen sind.

Lösung 1: 0,1 g Ninhydrin (Merck Art. Nr. 6762) wird in 50 ml Äthanol (Merck Art. Nr. 986) gelöst, 10 ml Essigsäure (Merck Art. Nr. 63) sowie 2 ml Collidin (Merck Art. Nr. 2635) hinzugefügt.

Lösung 2: 0,5 g Kupfer(II)-nitrat (Merck Art. Nr. 2753) werden in 50 ml Äthanol (Merck Art. Nr. 986) gelöst.

Nach dem Aufsprühen mit einem Treibgas-Sprühsystem (Gazjet) wurden die Chromatogramme im Trockenschrank bei 110°C erhitzt, bis die gelb oder rot-violett erscheinenden Farbabstufungen deutlich hervortraten.

2.3.3. Chlor-Tolidin-Reaktion

Bei der Chlor-Tolidin-Reaktion, die vor allem die NH-CO-Gruppen anspricht, wird die DC-Platte mit den zu re-velierenden Substanzen zunächst mehrere Stunden lang chloriert. Die Chloratmosphäre wird dabei in einer Kammer aus gleichen Teilen einer 1,5%igen Kaliumpermanganatlösung und einer 10%igen Salzsäurelösung entwickelt. Vor dem Besprühen mit dem Gazjet-Treibgas-System läßt man die Platte im Abzug oder in einem nicht zu warmen Luftstrom gut lüften, bis keine Spur von Chlor vom Geruch mehr festgestellt werden kann.

Sprühreagens: 160 mg o-Tolidin,
30 ml Essigsäure und
1 g Kaliumjodid
werden mit aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt.

2.3.4. Ehrlich's Reagens

Das Ehrlich's Reagens eignet sich zum Nachweis von Aminen, Tryptophan, Tryptophan-haltigen Peptiden sowie sonstigen Tryptophanderivaten.

Dazu wird 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in einer Mischung von 25 ml Salzsäure (36%) und 75 ml Methanol gelöst und die DC-Folie damit besprüht. Ein anschließendes Erwärmen des Chromatogramms beschleunigt die Farbentwicklung.

2.4. Qualitative Auswertung und Dokumentation

Alle auf dem Chromatogramm sichtbaren Flecke wurden sofort mit einem Bleistift markiert und ihre Wanderungsweiten aus der Beziehung

$$R_f = \frac{\text{Entfernung des Fleckmittelpunktes vom Start}}{\text{Entfernung der Fließmittelfront vom Start}}$$

berechnet.

Da die Originale nach einiger Zeit verblässen, wurden davon sofort Fotokopien angefertigt, auf denen die verschieden gefärbten Substanzflecke näherungsweise mit Farbstiften nachempfunden werden konnten.

Zur originalgetreuen Wiedergabe einiger Chromatogramme wurden außerdem Diapositive auf Agfachrome 50 L erstellt.

Bei der photographischen Dokumentation der fluoreszierenden Flecke war die UV-Lichtquelle (Hanau Fluotest) in etwa 10 cm Abstand zum Chromatogramm montiert. In einem völlig abgedunkelten Raum konnten auf Fujichrome 100 bei Blende 4 und einer Belichtungszeit von etwa 20 sec gute Ergebnisse erzielt werden. Auf ein von Götz, Sachs, Mines (1978) und Gänshirt (1967) empfohlenes UV-Sperrfilter wurde verzichtet.

3. Zuordnung von dünnschichtchromatographischer und gelchromatographischer Speicheltrennung

3.1. Gelchromatographie

Bei der Gelchromatographie handelt es sich um die Auftrennung von Substanzgemischen nach dem Molekulargewicht bzw. der Molekülgröße. Die zu trennenden Substanzen werden in einer mobilen Phase an einer stationären Phase vorbeigeführt, wobei die Möglichkeit zum Stoffaustausch gegeben ist. Die stationäre Phase besteht aus einem in einen senkrecht stehenden Glaszylinder gefüllten Gel, in dessen Poren die zu trennenden Substanzen in mehr oder weniger starkem Ausmaß eindringen können. Je nach ihrer Größe werden sie vom durchströmenden Elutionsmittel (mobile Phase) von der Säule eluiert, wobei die kleinsten Moleküle zuletzt im Eluat erscheinen.

3.1.1. Trennbedingungen

Gel: Es wurde ein Gel auf der Basis von hydrophilen Vinyl-Polymeren verwendet:
Fractogel TSK HW-40(S) (Merck Art.Nr. 14983)
Korngröße 25 - 40 μm
Ausschlußgrenze für Proteine 3000

Säule: Zur Verfügung standen zwei hintereinander geschaltete LKB-Trennsäulen:

Gelbetthöhe	1. Säule	47,8 cm
	2. Säule	51,8 cm
		99,6 cm

Querschnitt	2,01 cm ²
Gelbettvolumen	1. Säule 96,07 cm ³
	2. Säule 104,12 cm ³
	200,19 cm ³

Elutionsmittel: 0,01 M $\text{NH}_4^+/\text{HCOO}^-$ -Puffer (pH 6,85)

Flußrate: 25 ml/h

Temperatur: 20 - 24 °C

Detektion: 206 nm

3.1.2. Versuchsanordnung und -durchführung

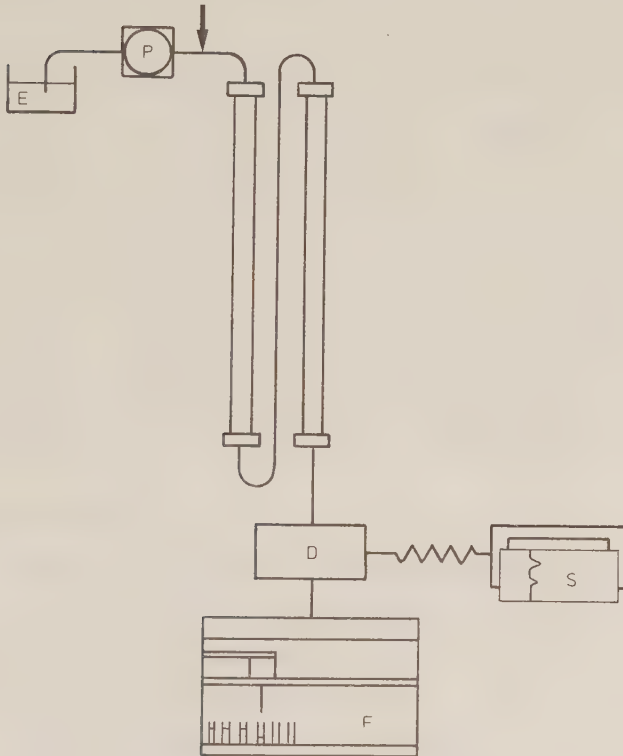


Abb. 1: Versuchsaufbau zur Gelchromatographie

E (Elutionsmittel): $0,01 \text{ M NH}_4^+/\text{HCOO}^-$ -Puffer
P (Pumpe): LKB 2132 Microperpex
Peristaltic Pump
D (Detektor): LKB 2238 Uvicord SII
F (Fraktionensammler): LKB 2211 Super Rac
S (Schreiber): W+W Recorder 1107

Zur Gelchromatographie stand die in Abb. 1 dargestellte Apparatur zur Verfügung.

40 mg gefriergetrockneter enteweißter Speichel wurden in 1,3 ml 0,01 M $\text{NH}_4^+/\text{HCOO}^-$ -Puffer gelöst und über eine Einspritzschleife aus Glas auf die Gelsäule gegeben. Eine Pumpe sorgte für einen gleichmäßigen Durchfluß des Elutionsmittels durch die beiden hintereinander geschalteten Säulen. Die Anwesenheit gelöster Substanzen im Eluat wurde von einem Durchflußphotometer bei einer Wellenlänge von 206 nm ermittelt und die gemessene Extinktion vom Schreiber aufgezeichnet. Ein Fraktionensammler fing das den aufgezeichneten Peaks entsprechende Eluat auf.

Um für die anschließenden dünnschichtchromatographischen Untersuchungen genügend Material zur Verfügung zu haben, wurde eine zweite Probe von 40 mg in gleicher Weise fraktioniert und die aus beiden Trennvorgängen erhaltenen jeweils korrespondierenden Fraktionen vereinigt.

3.2. Dünnschichtchromatographie der gelchromatographisch gewonnenen Fraktionen

Die aus beiden Chromatographievorgängen gewonnenen Fraktionen wurden gefriergetrocknet, in einer Konzentration von 50 mg/ml in 50%iger Ameisensäure gelöst, auf DC-Folien aufgetragen und in den beiden Laufmitteln

- Chloroform - Methanol - 25% NH_3 - Wasser
- Butanol - Essigsäure - Wasser

unter den auf Seite 15 beschriebenen Bedingungen entwickelt.

Zum Nachweis der getrennten Substanzen wurden

- UV-Licht 254 und 366 nm
- Modifiziertes Ninhydrin-Reagens
- E h r l i c h' Reagens

verwendet.

III. Ergebnisse

1. Dünnschichtchromatographie

1.1. Enteiweißer Speichel

1.1.1. Eindimensionale Trennung

Die in den Vorversuchen ermittelten Laufmittelgemische

- Chloroform - Methanol - 25% NH_3 - Wasser -
- Butanol - Essigsäure - Wasser

ergaben die beste Trennung der niedermolekularen ninhydrinpositiven Bestandteile des enteiweißten Speichels. Die mit den verwendeten Detektionsmethoden nachweisbaren Fraktionen auf dem Chromatogramm und ihre im folgenden benutzten Bezeichnungen sind in den Abb. 2 und 3 dargestellt. Dazu sind verschiedene Nachweisverfahren erforderlich, die sich aber nicht unbedingt miteinander kombinieren lassen:

- UV-Licht

Durch Anregung mit ultravioletem Licht erfolgt keinerlei stoffliche Veränderung der Substanzen auf dem Chromatogramm, diese Methode ist deshalb gut vor der Behandlung mit anderen Reagentien anwendbar.

- Modifiziertes Ninhydrin-Reagens

- Chlor-Tolidin-Reaktion

Hierbei ist eine vorherige Behandlung des Chromatogramms mit Ninhydrin möglich.

- E h r l i c h ' Reagens

Chloroform - Methanol - Ammoniak - Wasser

Das in Abb. 2 dargestellte Verteilungsmuster der in diesem Laufmittelsystem erhaltenen Fraktionen gibt einen Überblick über alle nachweisbaren Flecke unter Zugrunde-

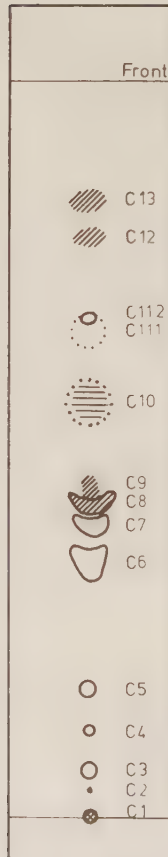


Abb. 2: Dünnschichtchromatogramm von 250 µg enteiweißtem Speichel

Laufmittel: Chloroform - Methanol - Ammoniak
 Laufstrecke: 17 cm

Detektion: ○ positive Reaktion mit Ninhydrin-Reagens/Chlor-Tolidin-Test

⊙ "heller Fleck"

▨ Fluoreszenz bei UV 366 nm

⊗ Fluoreszenzlöschung bei UV 254 nm

≡ Gelbfärbung bei E h r l i c h' Reagens

legung von Ergebnissen, die aus mehreren mit den verschiedenen Nachweisreagentien behandelten Dünnschichtchromatogrammen gewonnen wurden.

Bei Bestrahlen des Chromatogramms mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm) zeigt der mit C1 bezeichnete Startfleck eine deutliche Fluoreszenzlöschung, unter langwelligem UV-Licht (366 nm) fluoresziert C8 stark, C12 und C13 deutlich und C9 nur schwach. Bei beiden Wellenlängen ließ sich außerdem eine dezente, über die gesamte Breite der DC-Folie quer zur Laufrichtung zwischen C8 und C9 verlaufende Linie beobachten (vgl. Abb. 7).

Nach Aufsprühen des M o f f a t - L y t l e -Reagens' färbten sich die Fraktionen C1 bis C8 in Abstufungen rötliche Töne, die Flecke C6 - C8 zeigten dabei stets eine charakteristische nach oben konvexe Sichelform. Daneben tauchen auch "helle Flecke" auf (C10 und C11.1). Dieser Begriff wurde zur Bezeichnung der mit Ninhydrin-Reagens ausbleibenden Farbreaktion gewählt, wobei die Markierung der Substanz durch den sich leicht rosa, also etwas dunkler anfärbenden Plattengrund erfolgt. C10 erscheint dabei deutlich weiß, während der nicht immer darstellbare Fleck C11.1 leicht hellgelb getönt ist. C9, C11.2, C12 und C13 sind nicht ninhydrinpositiv.

Durch die Behandlung des Chromatogramms mit Chlorgas und das anschließende Besprühen mit Tolidinlösung erhält man gelbe bis orangefarbene Flecke auf blauem Grund, die in ihrer Intensität, Farbe und Größe schlecht reproduzierbar sind und stark mit der aufgetragenen Speichelmenge variieren. Stets zeigten C1 und C11.2 eine deutliche Reaktion, während C3, C5 und C12 mit dem Chlor-Tolidin-Test nicht immer nachweisbar waren.

Die mit C10 bezeichnete Fraktion färbt sich nach Besprühen mit E h r l i c h' Nachweisreagens gelb.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die R_f -Werte und das Verhalten der Fraktionen C1 bis C13 bei verschiedenen Detektionsmethoden. Die darin angegebenen R_f -Werte sind aus mindestens drei Chromatogrammen ermittelt und beziehen sich auf die Startmenge von 250 µg Speichel.

Fraktion	R_f	UV-Licht 254 366		Ninhydrin	Chl.T.	EHRLICH' R.
C1	0	*	-	rot	++	-
C2	0,03	-	-	(rot)	-	-
C3	0,07	-	-	rot	(+)	-
C4	0,12	-	-	(rot)	-	-
C5	0,17	-	-	rot	(+)	-
C6	0,33	-	-	rot	-	-
C7	0,38	-	-	rot	-	-
C8	0,40	-	+++	rot	-	-
C9	0,43	-	+	-	-	-
C10	0,53	-	-	weiß	-	gelb
C11.1	0,65	-	-	(hellgelb)	-	-
C11.2	0,68	-	-	-	++	-
C12	0,78	-	++	-	(+)	-
C13	0,82	-	++	-	-	-

Tab. 1: R_f -Werte und Nachweisverhalten der Fraktionen C1 bis C13

* fluoreszenzlöschend

() schwach und nicht immer darstellbar

Butanol - Essigsäure - Wasser

Mit diesem sauren Laufmittelsystem läßt sich enteiweißter Speichel im Gegensatz zu dem vorher beschriebenen basischen Gemisch zwar in weniger Substanzflecke trennen, es zeichnet sich jedoch durch gut reproduzierbare Ergebnisse, sowie differenzierteres und eindeutigeres Färbeverhalten der damit darstellbaren Fraktionen aus. In Abb. 3 ist ein solches Dünnschichtchromatogramm mit allen nachweisbaren Fraktionen wiedergegeben.

Ultraviolette Licht der Wellenlänge 254 nm ergibt im Bereich des mit B1 bezeichneten Startflecks Fluoreszenzlöschung, langwelliges UV-Licht (366 nm) regt in B7, B8 und B9 enthaltene Substanzen zu Fluoreszenz an, wobei B7 schwach, B8 stark und B9 noch deutlich fluoresziert.

Modifiziertes Ninhydrin-Reagens läßt die Fraktionen B1 bis B6 in Braun-, Violett- oder Rottönen deutlich auf fast ungefärbtem Plattengrund hervortreten, dabei zeigt B5 stets eine starke Rotfärbung bei einer charakteristischen Halbkreisform. Von den "hellen Flecken" B7 und B8 ist lediglich B7 regelmäßig darstellbar. B9 reagiert nicht mit Ninhydrin.

Bei Anwendung des Chlor-Tolidin-Tests färbt sich neben B5 der Startfleck B1 stark orange-gelb, während die Fraktionen B2, B3 und B8 erst bei Startmengen über 250 µg mit dieser Methode darstellbar sind.

E h r l i c h' Nachweisreagens ergibt eine gelbe Farbreaktion des "weißen Flecks" B7.

Die mittleren R_F -Werte der Fraktionen B1 bis B9 bei einer aufgetragenen Speichelmenge von 250 µg, sowie ihr Fluoreszenz- und Färbeverhalten sind Tab. 2 zu entnehmen.

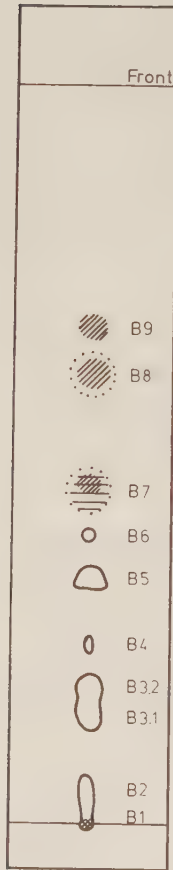


Abb. 3: Dünnschichtchromatogramm von 250 µg enteiweißtem Speichel

Laufmittel: Butanol - Essigsäure - Wasser
 Laufstrecke: 17 cm
 Detektion:

- positive Reaktion mit Ninhydrin-Reagens/Chlor-Tolidin-Test
- ⊙ "heller Fleck"
- /// Fluoreszenz bei UV 366 nm
- ⊗ Fluoreszenzlöschung bei UV 254 nm
- ≡ Gelbfärbung bei Ehrlich's Reagens

Fraktion	R_F	UV-Licht		Ninhydrin	Chl.T.	EHRlich' R.
		254	366			
B1	0	*	-	braun- violett	+++	-
B2	0,04	-	-	violett	(+)	-
B3.1	0,14	-	-	violett	(+)	-
B3.2	0,18	-	-	rot	(+)	-
B4	0,24	-	-	rot	-	-
B5	0,33	-	-	starkrot	++	-
B6	0,39	-	-	(rot)	-	-
B7	0,45	-	+	weiß	-	gelb
B8	0,60	-	+++	(hellgelb)	+	-
B9	0,67	-	++	-	-	-

Tab. 2: R_F -Werte und Nachweisverhalten der Fraktionen B1 bis B9

* fluoreszenzlöschend

() schwach und nicht immer darstellbar

Abhängigkeit der Trennleistung von der Auftragemenge

Die in den Abb. 2 und 3 wiedergegebenen Verteilungsmuster gelten für eine Auftragemenge von 250 µg enteweißtem Speichel.

Bei weniger als 250 µg ändern sich das Fleckenmuster und die R_F -Werte der gefundenen Fraktionen kaum, jedoch ist der Nachweis von bereits bei größerer Startmenge

schwach erkennbaren Fraktionen (C9 oder B6) meist nicht mehr möglich.

Dagegen führt eine Beladung im Startfleck von 500 µg oder mehr v.a. im Laufmittelsystem Chloroform - Methanol - Ammoniak zu verändertem Verteilungsmuster, d.h. der Trenneffekt nimmt ab - C6 und C7 werden nicht mehr getrennt - und die R_f -Werte der Fraktionen C5 bis C10 sind deutlich verringert. Der Substanznachweis mithilfe des Chlor-Tolidin-Tests ergab positive Reaktionen von C1, C3, C5, C6/C7, C10, C11.2, C12 sowie von B1, B2, B3, B4, B5, B6, B8, d.h. der Mehrzahl aller gefundenen Fraktionen.

Die bei größerer Auftragemenge veränderten Fleckenmuster sind in der Abb. 4 dargestellt.

Mehrfachentwicklung

Um eine Verbesserung des Trenneffekts zu erreichen, wurden Dünnschichtchromatogramme in der üblichen Weise entwickelt, getrocknet und anschließend ein zweites Mal mit jeweils dem gleichen Laufmittel behandelt.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigten jedoch, daß sich zwar

- die einzelnen Flecken/Fleckengruppen weiter voneinander trennten,

daß aber die Substanzflecke auf dem Chromatogramm im Vergleich zur einfach durchgeführten Entwicklung

- vergrößert,
- diffuser begrenzt,
- in ihrer Farbtintensität beim Nachweis mit Ninhydrinreagens vermindert

waren.

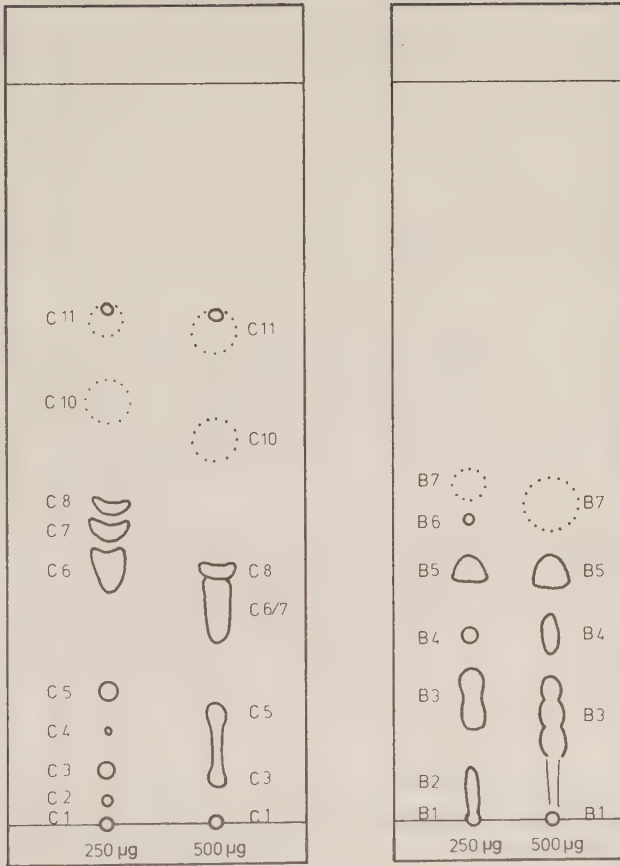


Abb. 4: Dünnschichtchromatogramme von 250 µg und 500 µg enteiweißtem Speichel

Laufmittel: Chloroform - Methanol - NH₃ (links)
Butanol - Essigsäure - H₂O (rechts)

1.1.2. Zweidimensionale Trennung

Zur zweidimensionalen Chromatographie wurden 500 µg enteweißter Speichel auf die DC-Folie aufgetragen und nacheinander in den Laufmitteln

I Chloroform - Methanol - Ammoniak - Wasser

II Butanol - Essigsäure - Wasser

entwickelt. Zu Vergleichszwecken wurden bei beiden Entwicklungsvorgängen eindimensionale Dünnschichtchromatogramme von je 500 µg Speichel erstellt.

Wie aus Abb. 5 ersichtlich, trennt enteweißter Speichel bei zweidimensionaler Technik in mindestens 16 Fraktionen, davon sind 10 ninhydrinpositiv (A1 bis A10), d.h. reagieren in rot-violetten Tönen mit dem Nachweisreagens, zwei weitere tauchen als "helle Flecke" auf (A12 und A14).

Die Ergebnisse der zweidimensionalen Trennung zeigen, daß im Startfleck B1 neben den auch in C1 festgehaltenen Molekülen noch weitere kleine Fraktionen liegenbleiben, die - in Abb. 6 nicht näher bezeichnet - etwa in Höhe von C10 - C11 laufen. Der schwach fluoreszenzlöschende Fleck A11, der in Laufmittel I unter C1 einzuordnen ist, läßt sich in Laufmittel II, wo er im Bereich von B7 anzusiedeln wäre, nicht nachweisen. A2 und A3 können im basischen Laufmittelsystem gut getrennt werden, während der aus sieben Komponenten bestehende ninhydrinpositive Komplex A4 - A10 durch das saure Gemisch immerhin in vier bis fünf Flecke aufgetrennt wird. Dabei kann A10 bzw. B5 möglicherweise bereits als rein angesehen werden. Durch die zweidimensionale Chromatographie konnte außerdem nachgewiesen werden, daß bei B7 und B8 die Charakteristika des "hellen Flecks" und der Fluoreszenz mit großer Sicherheit nicht einer Substanz zuzuordnen sind, sondern durch zufällige Überlagerung zweier Komponenten entstehen (A12 und

A13, A14 und A15). Entsprechendes gilt für C8.

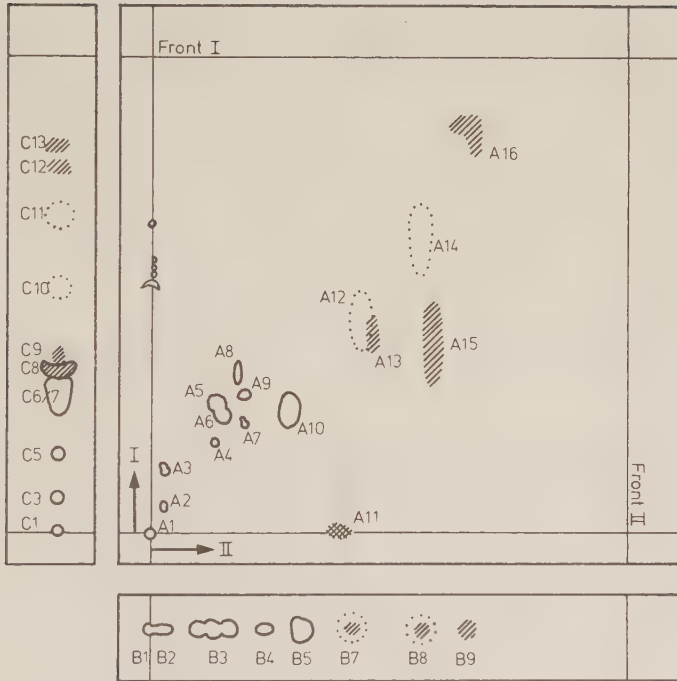


Abb. 5: Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm und eindimensionale Vergleichschromatogramme von 500 µg Speichel

Laufmittel: I Chloroform - Methanol - NH_3
II Butanol - Essigsäure - H_2O^3

Detektion: ○ Ninhydrinreagens
○ "heller Fleck"
▨ Fluoreszenz bei UV 366 nm
▩ Fluoreszenzlösung bei UV 254 nm

In Tab. 3 wurde eine Zuordnung der Fraktionen A1 bis A16 zu den Fraktionen C1 bis C13, bzw. B1 bis B9 anhand der R_F -Werte und des Färbe- und Fluoreszenzverhaltens (vgl. Abb. 5) versucht.

Fraktion	Entsprechende Fraktionen	
A1	C1	B1
A2	C3	B2
A3	C5	B2
A4	*	}
A5	}	
A6		}
A7		
A8		}
A9	}	
A10		}
A11	}	
A12		}
A13	}	
A14		}
A15	}	
A16		}

Tab. 3: Zuordnung der Fraktionen A1 - A16 zu den entsprechenden Fraktionen bei eindimensionaler Dünnschichtchromatographie

* keine eindeutige Zuordnung möglich

1.2. Vergleichssubstanzen

Das dünnschichtchromatographische Verhalten von 19 Aminosäuren wurde in beiden verwendeten Laufmittelsystemen untersucht.

Dabei konnte beobachtet werden, daß

- die polaren Aminosäuren (v.a. Lysin und Arginin) nur kleine Wanderungstrecken zurücklegen,
- die unpolarereren Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan, Methionin, Isoleucin, Leucin, Valin) relativ am weitesten laufen,
- die Farbe bei Reaktion mit den Ninhydrinreagens nicht nur von der jeweiligen Aminosäure, sondern auch vom verwendeten Fließmittel abhängt,
- mit dem Chlor-Tolidin-Test nicht alle Aminosäuren nachgewiesen werden können und im sauren Laufmittelmischung diese Reaktion meist stärker auftritt,
- Cystein nur im basischen Fließmittel darstellbar ist,
- Asparagin lediglich schwache Farbreaktion mit dem Ninhydrinreagens zeigt.

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse findet sich in Tab. 4.

AS	Chloroform-MetOH-NH ₃			ButOH-Essigsre.-H ₂ O		
	R _f	Ninhydrin	Chl.T.	R _f	Ninhydrin	Chl.T.
Lys	0,12	rot	+++	0,04	rot-viol.	+++
Arg	0,14	rot	+++	0,05	rot-viol.	+++
Asp	0,23	violett	+/-	0,14	bl.-viol.	-
Glu	0,32	rot	++	0,19	rot-viol.	++
Gly	0,37	or.braun	-	0,15	orange	-
Ser	0,38	rot	+/-	0,15	rot-lila	+
Pro	0,39	hellgelb	++	0,13	hellgelb	+++
Asn	0,42	(hellbr.)	+	0,08	(rot)	++
Cys	0,45	braun	-	*	-	-
Gln	0,45	rot	+/-	0,13	rot-viol.	++
Ala	0,46	rot	-	0,19	rot-viol.	-
Thr	0,50	or.braun	-	0,19	rot	+/-
His	0,50	rot-br.	-	0,04	br.-viol.	++
Val	0,61	rot	-	0,29	rot	-
Leu	0,66	rot	-	0,37	rot	-
Ile	0,67	rot	-	0,35	rot	-
Met	0,72	braun	+/-	0,31	rot	+/-
Trp	0,73	braun	+	0,40	braun	++
Phe	0,74	rot-br.	+	0,40	braun	++

Tab. 4: Ergebnisse der eindimensionalen Dünnschichtchromatographie von 19 Aminosäuren

* nicht nachweisbar
 () schwach gefärbt
 br. braun
 or. orange
 bl. blau
 viol. violett

Vergleichende dünnschichtchromatographische Untersuchungen des Hexapeptids Leu-Trp-Met-Arg-Phe-Ala (vgl. Tab. 5) ergaben, daß dieses Peptid

- in beiden Laufmittelsystemen im oberen Bereich (den unpolaren Aminosäuren entsprechend) läuft,
- mit dem M o f f a t - L y t l e - Reagens zu einem braunen Farbprodukt reagiert,
- sich mit dem Chlor-Tolidin-Test schlecht nachweisen läßt,
- UV-Licht der Wellenlänge 254 nm absorbiert,
- bei Anregung mit langwelligem UV-Licht nicht fluoresziert,
- wie die Aminosäure Tryptophan bei Besprühen des Chromatogramms mit E h r l i c h' Reagens sofort eine violette Farbe annimmt, die durch Nacherhitzen der DC-Folie noch vertieft wird.

	Hexapeptid	Tryptophan
R _f -Wert LM I	0,78	0,73
LM II	0,46	0,40
Ninhydrinreagens	schwach braun	braun
Chlor-Tolidin-Test	+	++
UV-Licht 254 nm	*	*
366 nm	-	-
EHRlich' Reagens	violett	violett

Tab. 5: Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Untersuchung des Hexapeptids und der Aminosäure Tryptophan
 LM I Chloroform - Methanol - Ammoniak
 LM II Butanol - Essigsäure - Wasser
 * fluoreszenzlöschend

2. Zuordnung von dünnschichtchromatographischer und gelchromatographischer Speicheltrennung

2.1. Gelchromatographie

In Abb. 6 ist das Gelchromatogramm von 40 mg gefriergetrockneten enteiweißten Speichels, gelöst in 1,3 ml Puffer, dargestellt.

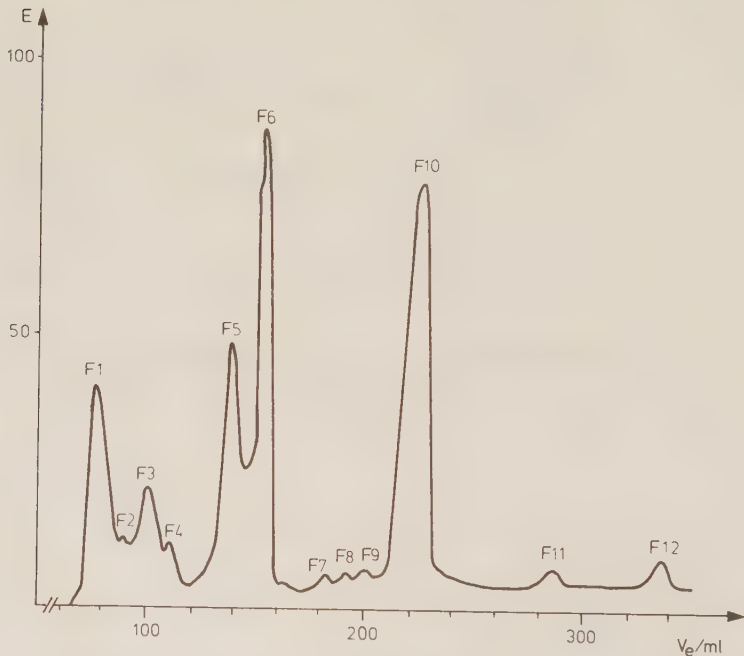


Abb. 6: Elutionsdiagramm von 40 mg enteiweißtem Speichel

Säule: LKB
Gelbett: (47,8 cm + 51,8 cm) x 2,01 cm² =
200,20 cm³
Gel: Fractogel TSK HW-40(S)
Eluens: 0,01 M NH₄⁺-HCOO⁻-Puffer
Flußrate: 25 ml/h
Detektor: UV 206 nm

Unter den beschriebenen Bedingungen trennt enteweißter Speichel in 12 Hauptpeaks auf. Das in der Abszisse des Diagramms dargestellte Elutionsvolumen stellt ein Maß für die Verweildauer der Substanzen in den Poren des Gels dar und ermöglicht so qualitative Aussagen über die Molekülgröße der eluierten Substanzen. Von insgesamt 80 mg aufgegebener Speichelmenge konnten 67,5 mg (entsprechend 84,3%) nach der Chromatographie gewonnen werden.

Nach W e r n i c k e (1982) liegt die Ausschlußgrenze des verwendeten Gelytys für Proteine bei einem Molekulargewicht von 3.000. Da das Totvolumen für diese Säule auf 70 bis 80 ml bestimmt wurde, kann davon ausgegangen werden, daß in der Fraktion F1 mit einem Elutionsmaximum von 79 ml Proteine mit einem MG um 3.000 vorhanden sind.

Die Fraktionen F1 bis F12 enthalten demnach Peptide mit geringerem Molekulargewicht als 3.000, wobei die für die Trennung zugrundeliegende Permeationsfähigkeit der Moleküle in die Gelkörner von F2 nach F12 zunimmt, d.h. die Fraktionen F2 bis F12 sind nach abnehmender Raumerfüllung bzw. in etwa nach dem Molekulargewicht geordnet.

2.2. Dünnschichtchromatographie der gewonnenen Fraktionen

Von den gelchromatographisch gewonnenen Fraktionen F1 - F12 wurden jeweils 250 µg des Trockenrückstandes auf DC-Folien aufgetragen und zusammen mit 250 µg nicht fraktioniertem enteweißtem Speichel dünnschichtchromatographisch untersucht, um diese beiden Trennverfahren in Beziehung setzen zu können.

Die Abb. 7 - 10 zeigen die fluoreszierenden und ninhydrinpositiven Komponenten der gelchromatographisch er-

mittelten Fraktionen, die keineswegs bereits reine Substanzen, sondern Substanzgemische darstellen - wie besonders die Abb. 8 und 10 verdeutlichen.

Um die Zuordnung der Gelchromatographie zur Dünnschichtchromatographie zu vereinfachen, wurden nur die Hauptkomponenten der Fraktionen F1 - F12 betrachtet:

- Der Hauptanteil der hochmolekularen Fraktion F1, die bei 79 ml von der Säule eluiert wurde, bleibt am Start liegen und entspricht im LM I dem Startfleck C1. Im LM II setzt sich der Startfleck B1 dagegen auch aus niedermolekularen Substanzen (aus F2 - F6) zusammen. Daneben enthält F1 aber auch wandernde Substanzen mit R_f -Werten bis 0,44 im LM I, bzw. 0,04 (entsprechend B2) im LM II.
- In der Gruppe F2 - F4 enthält nur F3 einen wesentlichen ninhydrinpositiven Anteil, der C3 bzw. B2 zuzuordnen ist.
- Die Fraktionen F5 und F6 mit Elutionsvolumina von 140 bzw. 156 ml bilden den Hauptanteil der ninhydrinpositiven Speichelbestandteile, der dem Komplex C6 - C8 bzw. der Gruppe B31 - B4 entspricht. Daneben enthält F6 C5 bzw. B2 zuzuordnende Komponenten und einen nur im sauren Fließmittel darstellbaren fluoreszenzlöschenden Anteil mit einem R_f -Wert von 0,34.
- Wenn man von dem schwach darstellbaren Fleck in F9 ansieht, sind in der niedermolekularen Gruppe F7 - F12 nur in F10 ($V_e=228$ ml) wesentliche ninhydrinpositive Speichelbestandteile enthalten. Im LM I sind sie in C5 und C6-8 einzuordnen, im LM II bilden sie die niedermolekularen Anteile von B2 und B31 - B4.

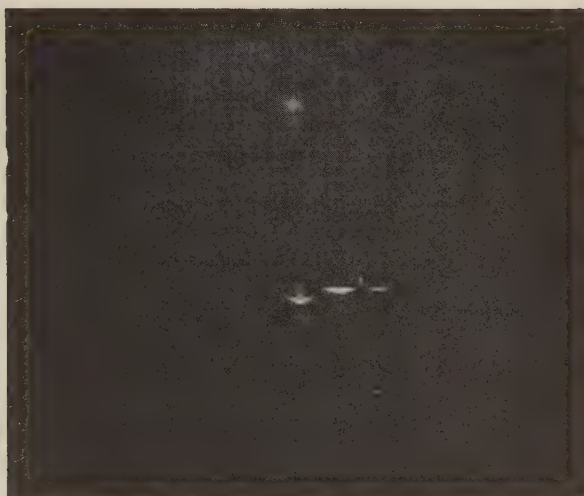


Abb. 7: Dünnschichtchromatogramm von F1 - F12
Laufmittel: Chloroform - Methanol - NH_3
Detektion: UV-Licht (366 nm)
aufgetragen: F1 - F6, Speichel, F7 - F12



Abb. 8: Dünnschichtchromatogramm von F1 - F12
Laufmittel: Chloroform - Methanol - NH_3
mod. Ninhydrin-Reagens
aufgetragen: F1 - F6, Speichel, F7 - F12



Abb. 9: Dünnschichtchromatogramm von F1 - F12
Laufmittel: Butanol - Essigsäure - Wasser
Detektion: UV-Licht (366 nm)
aufgetragen: F1 - F6, Speichel, F7 - F12



Abb. 10: Dünnschichtchromatogramm von F1 - F12
Laufmittel: Butanol - Essigsäure - Wasser
Detektion: mod. Ninhydrin-Reagens
aufgetragen: F1 - F12, Speichel

- Die Hauptkomponente des "hellen Flecks" C10/B7 ist in Fraktion F8 enthalten, wie dieser reagiert sie gelb mit dem E h r l i c h' Nachweisreagens. Darüberhinaus konnte in F8 ein weiterer E h r l i c h-positiver Fleck gefunden werden, der im enteweißten Speichel nicht nachzuweisen war. Das gleiche gilt auch für eine fluoreszenzlöschende und E h r l i c h-positive Komponente aus F10.
- Bei Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht zeigten alle Startpunkte - sowohl der Fraktionen F1 - F12 als auch der Speichelproben - fluoreszenzlöschende Eigenschaften. Wie bereits oben angesprochen, konnten in F10 und im sauren Laufmittel auch in F6 fluoreszenzlöschende Anteile gefunden werden, die sich im unfraktionierten Speichel nicht nachweisen lassen.
- Die wenigstens drei fluoreszierenden Anteile des enteweißten Speichels konnten nur teilweise in den gelchromatographisch gewonnenen Fraktionen wiedergefunden werden (vgl. Abb. 7, 9, 11, 12). Die stärkste Fluoreszenz hatte in beiden Laufmittelsystemen die bei 185 ml eluierte Fraktion F7, die in dieser Eigenschaft C8/B8 entspricht. Nur im Fließmittel Chloroform - Methanol - Ammoniak ließ sich eine C12 oder C13 zuzuordnende fluoreszierende Substanz in der Fraktion F10 nachweisen.

Diese Ergebnisse sind in den Abb. 11 und 12 zusammengefaßt. Eine Übersicht über die wichtigsten dünnschichtchromatographisch nachweisbaren Komponenten der gelchromatographisch gewonnenen Fraktionen und ihre Lauf-, Fluoreszenz- und Färbeeigenschaften gebendie Tab. 6 und 7.

	R _f	Ninhydrin	UV-Licht 254 366		EHRlich' R.
F1	0 0-0,44	violett-braun violett	* -	- -	- -
F2	-	-	-	-	-
F3	0,06	rot	-	-	-
F4	-	-	-	-	-
F5	0,29 0,33 0,35	rot rot rot	- - -	- - -	- - -
F6	0,16 0,33 0,35 0,37	rot rot rot rot	- - - -	- - - -	- - - -
F7	0,41	-	-	+++	-
F8	0,52 0,64	weiß -	- -	- -	stark gelb schwach gelb
F9	0,43	schwach rot	-	-	-
F10	0,17 0,39 0,40 0,67 0,83	schwach rot schwach rot schwach rot - -	- - - * -	- - - - +	- - - stark gelb -
F11	-	-	-	-	-
F12	-	-	-	-	-

Tab. 6: Übersicht über die Hauptkomponenten von F1 - F12
LM I: Chloroform - Methanol - Ammoniak

* fluoreszenzlöschend

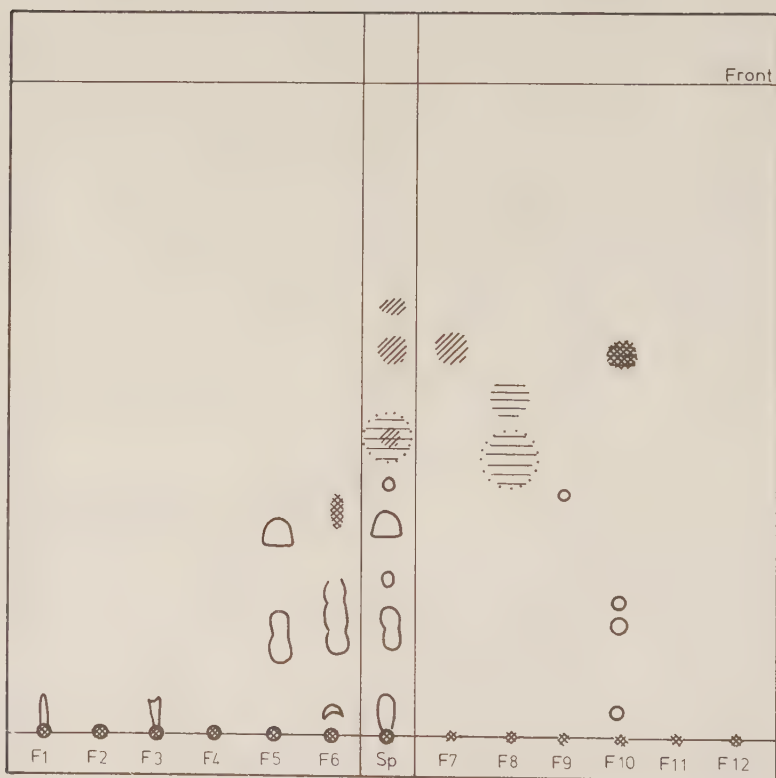


Abb. 12: Vereinfachtes Dünnschichtchromatogramm der Fraktionen F1 - F12 und von 250 µg Speichel

Laufmittel: Butanol - Essigsäure - Wasser

Detektion : ○ Ninhydrin-Reagens
 ⊙ "heller Fleck"
 ⊘ Fluoreszenz bei UV 366 nm
 ⊗ Fluoreszenzlöschung bei UV 254 nm
 ⊞ Gelbfärbung bei E h r l i c h ' Reagens

	R _f	Ninhydrin	UV-Licht 254 366		EHRlich' R.
F1	0 0-0,04	braun-violett violett	* -	- -	- -
F2	0	rot	* -	- -	- -
F3	0 0,03	rot-braun violett	* -	- -	- -
F4	0	rot-braun	* -	- -	- -
F5	0 0,13 0,17 0,31	rot-braun rot-violett rot-violett stark rot	* - - -	- - - -	- - - -
F6	0 0,04 0,13 0,17 0,21 0,34	rot-braun rot rot-violett rot-violett rot-violett -	* - - - - *	- - - - - -	- - - - - -
F7	0,60	-	-	+++	-
F8	0,43 0,52	weiß -	- -	- -	stark gelb -
F9	0,37	schwach rot	-	-	-
F10	0,03 0,17 0,21 0,59	schwach rot rot-violett rot-violett -	- - - *	- - - -	- - - stark gelb
F11	-	-	-	-	-
F12	-	-	-	-	-

Tab. 7: Übersicht über die Hauptkomponenten von F1 - F12
LM II: Butanol - Essigsäure - Wasser

* fluoreszenzlöschend

Die beschriebenen Ergebnisse gestatten nun umgekehrt Aussagen über die Molekülgrößenverhältnisse in den Fraktionen C1 - C13 bzw. B1 - B9.

Hauptkomponenten der Fraktionen C1 - C13:

- C1: F1 (R_f 0,00)
- C2: nicht bestimmbar
- C3: F3 (R_f 0,06)
- C4: nicht bestimmbar
- C5: F6 (R_f 0,16)
F10 (R_f 0,17)
- C6-8: ninhydrinpositive Komponenten:
F5 (R_f 0,29)
(R_f 0,33)
(R_f 0,35)
F6 (R_f 0,33)
(R_f 0,35)
(R_f 0,37)
F10 (R_f 0,39)
(R_f 0,40)
fluoreszierender Anteil von C8:
F7 (R_f 0,41)
- C9: nicht eindeutig bestimmbar
- C10: F8 (R_f 0,52)
- C11: nicht bestimmbar
- C12: } F10 (R_f 0,83)
- C13: }

Der mehrkomponentige Komplex C6-8 ist im einzelnen nicht differenzierter zuzuordnen, lediglich die fluoreszierende Komponente kann genau eingeordnet werden.

Hauptkomponenten der Fraktionen B1 - B9:

- B1: F1 - F6 (jeweils R_f 0,00)
- B2: F1 (R_f 0,00 - 0,04)
F3 (R_f 0,03)
F6 (R_f 0,04)
F10 (R_f 0,03)
- B31: } F5 (R_f 0,13)
B32: } (R_f 0,17)
B4 }
F6 (R_f 0,13)
(R_f 0,17)
(R_f 0,21)
F10 (R_f 0,17)
(R_f 0,21)
- B5: F5 (R_f 0,31)
- B6: F9 (R_f 0,37)
- B7: "heller Fleck":
F8 (R_f 0,43)
fluoreszierender Anteil:
nicht bestimmbar
- B8: fluoreszierender Anteil:
F7 (R_f 0,60)
"heller Fleck":
nicht bestimmbar
- B9: nicht bestimmbar

Bei der ninhydrinpositiven Gruppe B3.1, B3.2, B4 ist keine Zuordnung der einzelnen Komponenten des Gemisches möglich.

IV. Diskussion

1. Dünnschichtchromatographie

Die Natur des in der zellfreien Phase des menschlichen Speichels vorkommenden "aktivierenden Prinzips" ist bis heute noch nicht restlos geklärt. Festzustehen scheint nur, daß es aus hoch- und niedermolekularen Anteilen zusammengesetzt ist, wobei kleineren Peptiden wohl die größte Bedeutung zukommt. 1958 isolierten K r ö n c k e et al. auf papierchromatographischem Weg vier Peptide, von denen zumindest eines glykolysesteigernde Wirkung vermuten ließ. Er nimmt aber gleichzeitig an, daß mit feineren Methoden noch mehr Peptide darstellbar seien.

Gegenüber der damals zur Verfügung stehenden Papierchromatographie besitzt die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelschichten in der Aminosäuren- und Peptidtrennung entscheidende Vorteile durch geringere Ausbreitung der Substanzflecke, die nach B r e n n e r, N i e d e r w i e s e r, P a t a k i, W e b e r (1962) in der Pulverstruktur des Kieselgels begründet liegen. B r e n n e r, N i e d e r w i e s e r zeigten 1960, daß aufgrund dieser strukturellen Eigenschaften bei der Trennung von Aminosäurengemischen eine Erhöhung der Empfindlichkeit bei Nachweisreaktionen mindestens um den Faktor 10 resultiert, sowie, daß durch größere Trennschärfe kleine Laufstrecken und enorm verkürzte Laufzeiten möglich sind. Zur zweidimensionalen Papierchromatographie benötigte K r ö n c k e etwa 20 mg gefriergetrocknetes Material, während in der vorliegenden Studie bereits mit 500 µg gute Ergebnisse erzielt wurden. Durch Konstanzhaltung der wichtigsten Parameter lassen sich auch bei der Dünnschichtchromatographie reproduzierbare Ergebnisse erreichen (B r e n n e r, N i e d e r w i e s e r, P a t a k i, F a h m y, 1962).

1.1. Experimentelles Vorgehen

Da die vorliegenden Untersuchungen im Rahmen von Versuchen zum "aktivierenden Prinzip" konzipiert waren, wurden speziell auf Peptidtrennungen ausgerichtete Methoden verwendet und auf ihre Anwendbarkeit bei Speicheltrennungen überprüft.

Zum Nachweis der gesuchten Peptide standen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung.

Das gebräuchlichste Reagens zur Detektion von Peptiden auf Dünnschichtchromatogrammen ist Ninhydrin, das nach C a l d i n (1960) mit NH_2 -Gruppen von Aminosäuren oder primären Aminen und aminoterminalen Gruppen von Peptiden zu einem rot-violetten Farbstoff, mit Prolin, Hydroxyprolin und N-terminalen Prolinresten von Peptiden zu einem schwach hellgelben Produkt reagiert. C a l d i n gibt außerdem an, daß Ninhydrin nicht mit tertiären oder aromatischen Aminen reagiert; nach P a t a k i ist die Ninhydrinreaktion wenig empfindlich bei höheren und versagt ganz bei cyclischen Peptiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die von B r e n n e r, N i e d e r w i e s e r (1960) empfohlene Modifikation des Ninhydrinnachweises nach M o f f a t und L y t l e verwendet, die spezifischere Färbungen ermöglicht, aber mit einer geringfügigen Abnahme der Empfindlichkeit verbunden ist. Als nachteilig erwies sich die starke Mitanfärbung des Plattengrundes nach Entwicklung im ammoniakhaltigen Laufmittelsystem. Dieser Effekt konnte aber durch gründliches Entlüften der Dünnschichtchromatogramme vor dem Besprühen mit dem M o f f a t - L y t l e - Reagens erheblich vermindert werden. Dennoch ließen sich nach Entwickeln im sauren Fließmittel differenziertere und

deutlicher vom ungefärbten Plattengrund hervortretende Färbungen erzielen.

P a t a k i (1966) und B r e n n e r et al. (1967) geben zum Nachweis von Peptiden bzw. Substanzen mit der Gruppe NH-CO die Chlor-Tolidin-Reaktion an. Bei der von ihnen empfohlenen Chlorierungsdauer von 15 - 20 Minuten konnte keine eindeutige Farbreaktion erreicht werden, deshalb wurde die Reaktionszeit auf mehrere Stunden ausgedehnt. Mit dieser Modifizierung ergaben sich gelb bis orangefarbene schlecht reproduzierbare Flecke auf blauem Grund. Dieses Phänomen führt P a t a k i (1963) auf ungenügende Entlüftung zurück - was indirekt auch für die vorliegende Arbeit zutrifft, da durch die extrem verlängerte Reaktionsdauer ein zu starker Chlorüberschuß im Kieselgel entstand.

Die undeutlichen Ergebnisse bei der Chlorierungszeit von 15 - 20 Minuten liegen wahrscheinlich in der im Vergleich zu Ninhydrin geringeren Empfindlichkeit begründet, da bei einer Startmenge von 500 µg deutlich vermehrt positive Reaktionen auftraten. In diesem Zusammenhang weisen S c h w a r t z und S h e r m a n (1982) außerdem auf die Tatsache hin, daß die Nachweisgrenze bei N-Chlorierungen durch Fluoreszenzindikatoren etwa auf den doppelten Wert erhöht wird. Derartige Substanzen waren auch in den verwendeten Kieselgelplatten enthalten.

Aus den oben geschilderten Gründen sind die Ergebnisse der deshalb nur bei wenigen Versuchen verwendeten Chlor-Tolidin-Färbung äußerst kritisch zu betrachten.

1.2. Dünnschichtchromatographie von enteweißtem Speichel

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen beschränkten sich auf die Trennung von mit Alkohol enteweißtem Speichel, da Untersuchungen von B r a m s t e d t et al. (1957), H a y und H a r t l e s (1965), sowie die Arbeit von K u t t e n b e r g e r (1983) zeigen, daß der Hauptteil der glykolytischen Aktivität des menschlichen Speichels von niedermolekularen Bestandteilen herrührt, die durch Behandlung mit Alkohol nicht ausgefällt werden.

Verwendet wurde stets frisch verarbeiteter Speichel eines Probanden, um Einflüsse durch variierende individuelle Peptidzusammensetzungen auf das von vielen Parametern abhängige dünnschichtchromatographische Trennergebnis zu vermeiden. Deshalb sind geringfügige Abweichungen des Trennmusters bei Proben anderer Herkunft zu erwarten.



1.2.1. Eindimensionale Dünnschichtchromatographie

Die nach Polaritätsunterschieden trennende Dünnschichtchromatographie von 250 µg enteweißten Speichels ergab 13 nachweisbare Fraktionen im Laufmittelsystem Chloroform - Methanol - Ammoniak und 9 im Gemisch Butanol - Essigsäure - Wasser.

Für die Fragestellung besonders von Bedeutung sind v.a. die ninhydrinpositiven Fraktionen, also C1 - C8 und B1 - B6, wobei C2, C4 und B6 nicht immer darstellbar waren. Hierbei handelt es sich um Aminosäuren, Pep-

tide mit freien NH_2 -Gruppen oder primäre Amine (vgl. S. 45), deren Polaritätscharakter von C1 nach C8, bzw. von B1 nach B6 abnimmt. Dies konnte auch bei vergleichenden Untersuchungen mit Aminosäuren beobachtet werden (vgl. S. 29). Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte darüber hinaus festgestellt werden, daß Schlüsse vom Laufverhalten im sauren bzw. basischen Fließmittel auf den Säure- oder Basencharakter der getrennten Substanzen unzulässig sind, da die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin in beiden Elutionsmittelsystemen geringere Wanderungsweiten zurücklegen als die sauren Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure (R_f -Werte vgl. Tab. 4).

C8 zeigte neben seinem ninhydrinpositiven Verhalten auch fluoreszierende Eigenschaften bei Anregung mit UV-Licht (366 nm), die nach U d e n f r i e n d (1962) und A l l e n (1981) auf Autooxidationsprodukte aromatischer Aminosäurederivate, v.a. von Tryptophanverbindungen, zurückzuführen seien. Der tryptophanspezifische Nachweis mit E h r l i c h' Reagens konnte diese Vermutung nicht bestätigen. Während die Aminosäure Tryptophan und das tryptophanhaltige Hexapeptid auf diesen Nachweis durch Bildung eines violetten Farbstoffs reagierten (vgl. S. 31), war das Ergebnis bei C8 negativ. Auch mit Hilfe der zweidimensionalen Technik (vgl. S. 26) und der dünnschichtchromatographischen Charakterisierung der gelchromatographisch gewonnenen Fraktionen (vgl. S. 42) konnte gezeigt werden, daß C8 durch zufällige Überlagerung einer ninhydrinpositiven und einer fluoreszierenden Komponente zustande kommt.

Die Fleckenverdichtung vor C9 und die bei ultraviolettem Licht dezent sichtbare Frontlinie zwischen C8 und C9 (vgl. S. 19 und Abb. 7) sprechen für eine chromatographische Fließmittelentmischung des Laufmittels Chloroform - Methanol - Ammoniak, was die schwerer reproduzierbaren Ergebnisse in diesem System erklären würde. Nach B r e n -

ner, Niederwieser, Pataki, Weber (1962) wandern die unpolaren Fließmittelkomponenten hinter der vordersten Front und mit ihnen die unpolaren Substanzen des aufgetragenen Gemischs, während die polarsten Anteile sich bis maximal zur hintersten Front bewegen. Bei C9 und den "hellen Flecken" C10, C11, B7 und B8 handelt es sich demzufolge um unpolare Substanzen als die ninhydrinpositiven Fraktionen C1 - C8, bzw. B1 - B6. Die bei 366 nm fluoreszierenden Flecke C12 und C13, analog dazu B8 und B9, sind die Speichelbestandteile mit der geringsten Polarität.

Stoffliche Natur der getrennten Substanzen

Bei den hier getrennten ninhydrinpositiven Speichelbestandteilen kann es sich - wie bereits oben erwähnt und durch eigene Untersuchungen bestätigt (vgl. S. 29 ff.) - theoretisch um Aminosäuren, primäre Amine, Aminosucker oder Peptide handeln, die nach Polaritätsunterschieden geordnet sind. Kuttenger (1983) trennte enteweißten Speichel über einen Kationenaustauscher und fand in der Kationenfraktion nahezu alle dünnschichtchromatographisch nachweisbaren ninhydrinpositiven Fraktionen. Deshalb kann mit großer Sicherheit bei den in dieser Arbeit getrennten ninhydrinpositiven Substanzen Kationencharakter angenommen werden, was auch im Zusammenhang mit dem "aktivierenden Prinzip" von großer Bedeutung ist.

Die Möglichkeit jedoch, daß es sich bei den chromatographierten Speichelbestandteilen vorwiegend um Aminosäuren handelt, scheidet nahezu aus, da freie Aminosäuren nur in geringen Mengen im Speichel vorkommen. Moor und Gilligan (1951) geben etwa die achtfache Menge peptidgebundener im Vergleich zu freien Aminosäuren an. Berzinskas et al. (1967) beschäftigten

sich mit ultrafiltrierbaren, ninhydrinpositiven Komponenten des Parotisspeichels und fanden als Hauptbestandteil Harnstoff, der die Konzentration freier Aminosäuren etwa um den Faktor 100 übersteigt. G i e b e l et al. (1982) untersuchten quantitativ freie Aminosäuren des Parotisspeichels mit Methoden der Mikropolyamiddünnschichtchromatographie von Dansylderivaten und fanden regelmäßig acht Aminosäuren, wobei Prolin mit $1,36 \mu\text{mol/l}$ den größten Anteil darstellt. Aus den von diesen Autoren angegebenen Werten lassen sich - unter Zugrundelegen des Befunds, daß 1 ml Speichelüberstand etwa 2 mg Lyophilisat ergab - die in der Startmenge von $250 \mu\text{g}$ enthaltenen freien Aminosäuremengen abschätzen. Bei Prolin würde die berechnete Menge von $0,02 \mu\text{g}$ im Startfleck weit unter der von F a h m y et al. (1961) angegebenen Nachweisgrenze von $0,1 \mu\text{g}$ für die Ninhydrinreaktion liegen. Die Konzentration der übrigen Aminosäuren läge auch unter Berücksichtigung der besseren Nachweisbarkeit allenfalls im Grenzbereich. Erschwert wird eine exakte Beurteilung dieses Sachverhalts aber durch folgende Faktoren:

- W o l d r i n g (1955), B a t t i s t o n e und B u r n e t t (1961), B e r z i n s k a s et al. (1967), D r e y f u s et al. (1968), P a p a n a y o t o u et al. (1973) beschäftigten sich ebenfalls mit der quantitativen Bestimmung freier Aminosäuren im Gesamt- oder Parotisspeichel. Die von ihnen angegebenen Aminosäuremuster und -konzentrationen weichen stark voneinander ab und liegen meist über den von G i e b e l et al. angegebenen Werten.
- Sämtliche mit dieser Problematik befaßten Untersucher verweisen auf starke individuelle Unterschiede. F o s d i c k und B l a c k w e l l (1949) fanden einen Zusammenhang mit der Kariesaktivität.

- Die Nachweisgrenzen der einzelnen Aminosäuren liegen durch das bei dieser Arbeit verwendete modifizierte Ninhydrinreagens höher als die von F a h m y et al. angegebenen Werte für die Ninhydrinreaktion (vgl. S. 45).

Die eben geschilderten Umstände machen die Ergebnisse insgesamt wenig vergleichbar und stellen die oben dargelegte Berechnung der im Start vorhandenen Aminosäurekonzentrationen in Frage. Gestützt auf die neuesten Untersuchungen von G i e b e l et al. (1982) kann jedoch davon ausgegangen werden, daß es sich bei den in der vorliegenden Arbeit getrennten ninhydrinpositiven Speichelbestandteilen wohl weniger um freie Aminosäuren als um Harnstoff und niedermolekulare Peptide handelt, deren Bedeutung im Zusammenhang mit dem "aktivierenden Prinzip" unumstritten ist.

Über die stoffliche Natur der "hellen Flecke" C10, C11, B7 und B8 besteht Unklarheit. Die zusätzliche Gelbfärbung von C10/B7 bei Besprühen mit dem E h r l i c h ' Nachweisreagens ließe z.B. ein aromatisches Amin vermuten (D a l g l i e s h, 1952), das nach C a l d i n nicht mit Ninhydrin reagieren würde. Bei den Flecken C11.1 und C11.2 könnte es sich möglicherweise um ein und dieselbe Substanz - z.B. ein nicht ninhydrinpositives cyclisches Peptid - handeln, dessen Konzentrationsmaximum im oberen Bereich die Nachweisgrenze der Chlor-Tolidin-Reaktion überschreitet. Diese Vermutungen haben allerdings rein hypothetischen Charakter und müßten erst durch weitergehende Untersuchungen abgeklärt werden.

Aus den auf S. 46 geschilderten Gründen wird darüberhinaus auf eine Diskussion der Flecke mit Chlor-Tolidin-positiver Reaktion verzichtet.

Startmenge

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst ein Überblick über alle unter den gewählten Bedingungen darstellbaren Speichelbestandteile gegeben werden.

Durch Auftragen von 250 µg konnten auch in geringer Konzentration enthaltene Fraktionen noch erfaßt werden, ohne die Trennung der Hauptkomponenten durch Überladungsphänomene zu beeinträchtigen. Bei einer Startmenge um 500 µg zeigte sich bei eindimensionaler Dünnschichtchromatographie im Laufmittel Chloroform - Methanol - Ammoniak bereits eine deutliche Verringerung der R_f -Werte des ninhydrinpositiven Hauptkomplexes C6-8 durch Erreichen grenzwertiger Konzentrationen. Brenner und Niedewieser beschreiben 1960 diese Abhängigkeit der R_f -Werte von der aufgetragenen Substanzmenge. Dieser Effekt ist im sauren Laufmittel vermutlich deshalb weniger deutlich ausgeprägt, weil die C6-8 entsprechenden Fraktionen (B3-5) weiter auseinander getrennt werden.

Zur zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie wurden wegen der prinzipiell höheren Nachweisgrenze (Fahmy et al., 1961) 500 µg benötigt.

Dieser für dünnschichtchromatographische Trennungen relativ hohe Substanzbedarf von 250 bzw. 500 µg ist damit zu erklären, daß bei der Aufbereitung des Speichels lediglich hochmolekulare Körper abgetrennt wurden, das Material aber nicht weiter gereinigt oder entsalzt wurde.

Mehrfachentwicklung

Die von verschiedenen Autoren empfohlene Mehrfachentwicklung oder fraktionierte Chromatographie brachte kei-

ne wesentliche Verbesserung des Trennergebnisses. Es kam im Lauf der Chromatographie zu "Dezentralisierungserscheinungen", also vergrößerten, diffuseren, schwächer gefärbten Flecken, die nach S c h r a t z und E g e l s (1958) durch das jeweilige Laufmittelsystem bedingt sind.

Bei vergleichbarem Zeit- und Arbeitsaufwand ist die unten besprochene zweidimensionale der fraktionierten Chromatographie weit überlegen.

1.2.2. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Durch Kombination beider Laufmittelsysteme in zweidimensionalem Vorgehen konnte eine weitere Auftrennung des enteweißten Speichels in insgesamt 16 Flecke erreicht werden. Die gute Trennung der ninhydrinpositiven Bestandteile in 10 Komponenten zeigte, daß bei der eindimensionalen Technik das Ergebnis noch nicht optimal ist. Daneben konnte gezeigt werden, daß

- C8, B7 und B8 aus je zwei Komponenten zusammengesetzt sind, daß also kein stofflicher Zusammenhang zwischen dem Fluoreszenzverhalten und der Reaktion bei Ninhydrinfärbung besteht,
- das Laufmittelsystem Butanol - Essigsäure - Wasser die ninhydrinpositiven Hauptkomponenten besser zu trennen vermag als das basische Fließmittel, wobei der deutlich darstellbare Fleck B5 wahrscheinlich bereits eine reine Substanz darstellt,
- das Laufmittelgemisch Chloroform - Methanol - Ammoniak aber z.B. in der Lage ist, die Frak-

tion B2 (entsprechend A2 und A3) deutlich zu trennen.

Die in Tab. 3 wiedergegebene Zuordnung der Fraktionen beider Laufmittelsysteme war ohne weiteres nicht eindeutig möglich, konnte aber durch die Ergebnisse der gelchromatographisch gewonnenen Fraktionen verifiziert werden.

Abschließend wäre noch anzumerken, daß die zweidimensionale Chromatographie nur bei der angegebenen Reihenfolge der beiden Fließmittel gute Ergebnisse liefert. Diese Beobachtung deckt sich mit der Empfehlung von Brenner et al. (1967), das schwerflüchtigere Laufmittel - in diesem Fall das butanolhaltige - erst in der zweiten Dimension zu verwenden.

1.3. Vergleichssubstanzen

Die Chromatographie der 19 Aminosäuren und des Hexapeptids hatte in der vorliegenden Arbeit in erster Linie die Zielsetzung, Aufschlüsse über die getrennten Speichelbestandteile zu ermöglichen, nicht dagegen, um die Trennung von Aminosäuren und niederen Peptiden in den beiden gewählten Laufmittelsystemen zu untersuchen. Hierbei können die Verhältnisse von Aminosäuren auf kleine Peptide durchaus übertragen werden (Brenner et al. 1967).

Die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen dieser Vergleichssubstanzen wurden bereits im Rahmen der eindimensionalen Speicheltrennung diskutiert.

2. Zuordnung von dünn-schichtchromatographischer und gelchromatographischer Speicheltrennung

2.1. Experimentelles Vorgehen

Um Aussagen über das Molekulargewicht bzw. die Molekülgröße der dünn-schichtchromatographisch erhaltenen Speichelfraktionen treffen zu können, wurde nach einer geeigneten Zuordnungsmöglichkeit von dünn-schicht- und gelchromatographischer Trennung gesucht.

Im Rahmen von Vorversuchen wurde zunächst an einer Methode gearbeitet, auf präparativen Dünnschichtplatten enteweißen Speichel in ausreichender Menge zu trennen, um anschließend die von der Platte abgenommenen Fraktionen gelchromatographisch dem Elutionsbild von unfraktioniertem Speichel gegenüberzustellen. Beim Gefriertrocknen der von der DC-Platte eluierten Fraktionen stellte sich jedoch heraus, daß während des Eluiervorgangs eine Beimengung von Fremdstoffen stattgefunden haben mußte, die etwa das Siebenfache der aufgetragenen Speichelmenge betrug. Der anschließende Versuch, die so gewonnenen Proben gelchromatographisch zu untersuchen, ergab nicht verwertbare Elutionsdiagramme, die bei allen Fraktionen auf ein vielfältiges Substanzgemisch hindeuteten, das keineswegs dem Speichel, sondern der Plattenbeschichtung entstammen mußte. Hierbei kommen neben Kieselgel noch Bindemittel oder Fluoreszenzindikatoren in Frage.

Die ersten Versuche, auf umgekehrtem Weg vorzugehen, nämlich den Speichel zuerst gelchromatographisch zu trennen und die so erhaltenen Fraktionen anschließend dünn-schichtchromatographisch zu untersuchen, scheiterten zunächst am verwendeten Puffersystem zur Gelchromatographie. Der anfangs benutzte $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaCl}$ -Puffer hinterließ beim

Gefriertrocknen einen Rückstand anorganischer Salze, der die Menge der enthaltenen Speichelbestandteile um ein Vielfaches übertraf und so ein Auftragen auf DC-Folien unmöglich machte.

Erst mit Verwendung des durch Lyophilisation völlig entfernbaren $\text{NH}_4^+/\text{HCOO}^-$ -Puffers gelang es, gelchromatographisch erhaltene Speichelfraktionen dünnschichtchromatographisch mit enteweißtem Speichel zu vergleichen.

2.2. Gelchromatographische Speicheltrennung

Trotz der relativ großen Säulenlänge von fast 1 m zur Verbesserung der Auflösung konnte keine Trennung in Reinstoffe erreicht werden, wie aus den zahlreichen Überlagerungen zweier oder mehrerer Peaks und den Schultern von F1, F5 und F6 abzuleiten ist. Lediglich F11 und F12 stellen möglicherweise bereits reine Substanzen dar, was aber z.B. durch Rechromatographie geklärt werden muß. Die Molekülgröße der erhaltenen 12 Fraktionen nimmt - soweit sie die gleiche Raumerfüllung aufweisen - von F1 nach F12 ab. Die Fraktion F1, die bei dem Ausschlußvolumen der Säule eluiert wurde, stellt den hochmolekularen Anteil des enteweißten Speichels mit einem Molekulargewicht um 3.000, also der Ausschlußgrenze, dar.

D i s t l e r und K r ö n c k e (1982) trennten auf gelchromatographischem Weg über Biogel P2 enteweißten Speichel und erhielten bei einer Ausschlußgrenze von 1800 fünf Hauptpeaks. Die Überprüfung der biologischen Aktivität ergab sowohl umsatzsteigernde als auch umsatzhemmende Fraktionen. Ihre Ergebnisse sind auf die hier durchgeführte gelchromatographische Speicheltrennung jedoch aufgrund der unterschiedlichen experimentellen Be-

dingungen nicht übertragbar.

Die gewonnenen Trockenrückstände der eluierten Fraktionen ergaben 84% der auf die Säule aufgegebenen Speichelmenge. Neben der Möglichkeit von Adsorptionsvorgängen an die stationäre Phase muß aber zunächst an banalere Ursachen wie experimentelle Verluste gedacht werden.

2.3. Dünnschichtchromatographie des fraktionierten Speichels

Die Dünnschichtchromatographie dieser Fraktionen (vgl. Abb. 8 und 10) ergab vielfältige Substanzgemische, wie vom Elutionsbild her bereits zu erwarten war. Durch Überlappungen der Peaks kam es zu Verunreinigungen mit den im Elutionsdiagramm jeweils benachbarten Fraktionen. Um das auf den ersten Blick verwirrende Bild für die anschließenden Betrachtungen zu vereinfachen, wurde das Ergebnis auf die Hauptbestandteile der einzelnen Fraktionen - charakterisiert durch die größten und am stärksten gefärbten Flecke - reduziert (vgl. Abb. 11 und 12).

Daraus sind folgende Schlußfolgerungen möglich:

- Die Fraktionen F5, F6 und F10 stellen die ninhydrin-positiven Hauptbestandteile des Speichels dar. Damit wurde das experimentelle Vorgehen der Gelchromatographie (insbesondere die auf das Absorptionsmaximum von Peptidbindungen ausgerichtete Detektion bei 206 nm) insofern bestätigt, als diese drei Fraktionen im Elutionsdiagramm auch die flächengrößten Peaks darstellen.

- Geringe ninhydrinpositive Anteile enthalten außerdem die Fraktionen F3 und F9, wobei sich F9 im Laufmittelgemisch Butanol - Essigsäure - Wasser auch in unfractioniertem Speichel als B6 meist deutlich darstellen läßt, während dies der starke Blindwert des Plattengrundes im basischen Laufmittel verhindert. Auch aus diesem Grund ist das saure Laufmittelsystem dem ammoniakhaltigen vorzuziehen.
- Die Fraktionen F2, F4, F11, F12 waren mit den gewählten Nachweismethoden nicht charakterisierbar. Es dürfte sich deshalb wohl - im Hinblick auf die Problemstellung - um relativ unbedeutende Speichelbestandteile handeln.

Ziel weitergehender Untersuchungen muß es sein, alle im Speichel vorhandenen Fraktionen über die Gelchromatographie rein darzustellen, z.B. mit Hilfe der Kombination von Re- und Dünnschichtchromatographie. Wenn dies erreicht ist, kann sowohl gezielt der Einfluß auf den Stoffwechsel oraler Mikroorganismen (durch Versuche im Warburg-Apparat) getestet, als auch ihre chemische Natur, z.B. durch Hydrolyse und Sequenzanalyse, aufgeklärt werden.

3. Stellung der Dünnschichtchromatographie in der Speicheltrennung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit den Möglichkeiten und Grenzen der dünnschichtchromatographischen Trennung von Speichel im Hinblick auf eine Anwendung in Untersuchungen zum "aktivierenden Prinzip". Deshalb lag das Bestreben darin, eine Auftrennung von Peptiden im enteweißten Speichel zu erreichen.

Es konnte gezeigt werden, daß die Dünnschichtchromatographie

- bei eindimensionaler Technik im Laufmittelsystem Butanol - Essigsäure - Wasser (40:15:10, v/v) unter den beschriebenen Bedingungen zufriedenstellende Trennung der ninhydrinpositiven Speichelbestandteile - bzw. der Peptide im Speichel, wie auf S. 49 ff. dargelegt - liefert, daß aber bei zweidimensionalem Vorgehen weit- aus bessere Ergebnisse erreichbar sind,
 - zur präparativen Gewinnung von Speichelfractionen nicht geeignet ist,
 - aber als äußerst feine Methode zum Nachweis selbst geringer Mengen zur Verfügung steht. Damit kann beispielsweise die Reinheit von gelchromatographisch ermittelten Fractionen überprüft und ihre Einordnung in die hier dargelegte Charakterisierung der dünnschichtchromatographischen Fractionen vorgenommen werden.
- A l l e n (1981) bestätigt die Brauchbarkeit der Dünnschichtchromatographie bei anschließender Detektion mit Ninhydrin, um kleinere Peptide in von Gel-säuren eluierten Fractionen nachzuweisen.

V. Zusammenfassung

Niedermolekulare ninhydrinpositive Substanzen im enteiweißten Speichel wurden mit dünnschichtchromatographischen Methoden getrennt, um die Anwendbarkeit dieses Verfahrens bei Untersuchungen zum "aktivierenden Prinzip" im menschlichen Speichel zu überprüfen.

Die beste Trennung ergab hierbei die zweidimensionale Technik mit

I. Chloroform - Methanol - 25% NH_3 - H_2O
(24:24:8:4, v/v)

II. Butanol - Essigsäure - H_2O
(40:15:10, v/v)

Bei eindimensionalem Vorgehen ist dem Laufmittel II der Vorzug zu geben, da es

- gute Reproduzierbarkeit gewährleistet,
- keine nachweisbare Fließmittelentmischung aufweist,
- eindeutigere Färbungen ermöglicht,
- geringere Abhängigkeit von der Startmenge zeigt,
- und vor allem die ninhydrinpositiven Speichelbestandteile besser aufzutrennen vermag.

Zur Detektion der Substanzen hat sich das modifizierte Ninhydrinreagens nach M o f f a t - L y t l e bewährt, während mit dem Chlor-Tolidin-Test keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden konnten.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde enteiweißter Speichel gelchromatographisch in 12 Hauptfraktionen - die noch

keine definierten Substanzen, sondern Gemische darstellen - getrennt und anschließend eine dünnschichtchromatographische Charakterisierung vorgenommen. Es konnte gezeigt werden, daß der Hauptteil der nachweisbaren ninhydrinpositiven Speichelbestandteile in den Fraktionen F5, F6 und F10 enthalten ist. Dabei handelt es sich mit großer Sicherheit um Peptide mit einem Molekulargewicht < 3.000 .

Wenn es gelingt, diese Fraktionen rein darzustellen, kann der Einfluß auf den Stoffwechsel oraler Mikroorganismen untersucht, und ein möglicher Zusammenhang mit dem "aktivierenden Prinzip" abgeklärt werden.

VI. Literaturverzeichnis

A l l e n G.

Sequencing of Proteins and Peptides -
Laboratory Techniques in Biochemistry and
Molecular Biology
North-Holland-Publishing Company
Amsterdam (1981)

B a t t i s t o n e G.C., G.W. B u r n e t t

The Free Amino Acid Composition of Human Saliva
Archs. oral Biol. 3, 161 (1961)

B e c k D.J., B.G. B i b b y

Whole Saliva, Salivary Sediment and Supernatant
as Fermenting Agents for Food
J. dent. Res. 40, 479 (1961)

B e r z i n s k a s V.J., A.Y. B a l e k j i a n,
K.C. H o e r m a n

Ultrafiltrable Ninhydrin-Positive Components of
Human Parotid Saliva
Archs. oral Biol. 12, 303 (1967)

B r a m s t e d t F., A. K r ö n c k e, R. N a u j o k s

Über ein den anaeroben Kohlenhydratabbau aktivie-
rendes Prinzip im menschlichen Speichel
Naturwissenschaften 44, 331 (1957)

B r e n n e r M., A. N i e d e r w i e s e r

Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäuren
Experientia 16, 378 (1960)

B r e n n e r M., A. N i e d e r w i e s e r,
G. P a t a k i

Aminosäuren und Derivate
In E. Stahl: Dünnschichtchromatographie -
Ein Laboratoriumshandbuch, 2. Auflage
Springer-Verlag, Berlin (1967)

- Brenner M., A. Niederwieser,
G. Pataki, A.R. Fahmy
Zur Reproduzierbarkeit der R_f in der Dünnschichtchromatographie
Experientia 18, 101 (1962)
- Brenner M., A. Niederwieser,
G. Pataki, R. Weber
Theoretische Grundlagen der Dünnschicht-Chromatographie
In E. Stahl: Dünnschichtchromatographie -
Ein Laboratoriumshandbuch
Springer-Verlag, Berlin (1962)
- Caldin D.J.
The Chemistry of Ninhydrin
Chem. Rev. 60, 39 (1960)
- Dalglish C.E.
The Relation between Pyridoxin and Tryptophan
Metabolism, Studied in the Rat
Biochem. J. 52, 3 (1952)
- Distler W., A. Kröncke
Einfluß von Speichel auf den Glukoseabbau
durch Streptococcus mutans
Vortrag vor der Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenforschung der DGZMK (1982)
- Dreyfus P.M., H.L. Levy, M.L. Efron
Concerning Amino Acids in Human Saliva
Experientia 24, 447 (1968)
- Fahmy A.R., A. Niederwieser,
G. Pataki, M. Brenner
Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäuren
auf Kieselgel G
Helv. Chim. Acta 44, 2022 (1961)
- Fosdick L.S., R.Q. Blackwell
The Determination of Amino Acid Content of
Fresh and Putrefied Saliva by Paper Partition
Chromatography
J. dent. Res. 28, 644 (1949)

G ä n s h i r t H.

Dokumentation der Dünnschicht-Chromatogramme
In E. Stahl: Dünnschichtchromatographie -
Ein Laboratoriumshandbuch, 2. Auflage
Springer-Verlag, Berlin (1967)

G i e b e l W., H.-M. S t r i e b e l,
H. B r e u n i n g e r

Biochemische Analyse freier Aminosäuren im
menschlichen Parotisspeichel
Laryng. Rhinol. Otol. 61, 70 (1982)

G ö t z W., A. S a c h s, H. W i m m e r

Dünnschichtchromatographie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1978)

G u g g e n h e i m B.

Über die Wirkung verschiedener Speichelfraktio-
nen auf die Atmung von Mundbakterien
Helv. Odont. Acta, Suppl. III, 59 (1966)

H a r t l e s R.L.

Metabolic Factors in Saliva
J. dent. Res. 42, 553 (1963)

H a r t l e s R.L., M.R. W a s d e l l

The Metabolism of the Oral Flora
6. Preliminary Observations on a Water-soluble
Factor in Saliva which enhances the Respiratory
and Glycolytic Activity of the Salivary Flora
Brit. Dent. J. 99, 334 (1955)

H a y D.I., R.L. H a r t l e s

The Effect of Saliva on the Metabolism of the
Oral Flora
Archs. oral Biol. 10, 485 (1965)

H a y D.I., R.L. H a r t l e s

Studies on the Glycolytic-Enhancing Properties of
Human Saliva
Archs. oral Biol. 11, 337 (1966)

H o l b r o o k I.B., P.C. M o l a n

A Further Study of the Factors Enhancing Glycolysis in Human Saliva
Archs. oral Biol. 18, 1275 (1973)

H o l b r o o k I.B., P.C. M o l a n

The Identification of a Peptide in Human Parotid Saliva Particularly Active in Enhancing the Glycolytic Activity of the Salivary Microorganisms
Biochem. J. 149, 489 (1975)

K a w a s a k i T.

On the Activation Factor in Human Saliva for Acid Fermentative Bacterial Metabolism
Bull. Tokyo dent. Coll. 5, 25 (1964)

K i r i m u r a K., M. M o r i t a, Y. M i s h i r o

Effect of Protein Hydrolysates on the Fermentative Activity of Streptococcus salivarius
J. dent. Res. 49, 890 (1970)

K l e i n b e r g I., D. C r a w, K. K o m i y a m a

Effect of Salivary Supernatant on the Glycolytic Activity of the Bacteria in Salivary Sediment
Archs. oral Biol. 18, 787 (1973)

K l e i n b e r g I., A. K a n a p k a, D. C r a w

Effect of Saliva and Salivary Factors on the Metabolism of the Mixed Oral Flora
Microbial Aspects of Dental Caries, A Special Supplement to Microbiology Abstracts - Bacteriology Vol. II, Eds. Stiles, Loesche, O'Brian
Information Retrieval Inc. Washington DC (1976)

K r ö n c k e A., F. B r a m s t e d t,
R. N a u j o k s, H. M a r g

Biochemische Speicheluntersuchungen
XI. Peptide im menschlichen Speichel
J. Dent. Belge 49, 391 (1958)

K u t t e n b e r g e r J.

Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Speichelbestandteilen
Med. Diss., Erlangen (1983)

- M e l v i l l e T.H., R.L. H a r t l e s
A Preliminary Study of the Effect of Saliva
Supernatant on the Glycolytic Activity of a
Pure Cultur of a Streptococcus
Archs. oral Biol. 11, 877 (1966)
- M i s h i r o Y., K. K i r i m u r a ,
H. I s h i h a r a
Observations on the Saliva Factor that Enhances
the Production of Lactic Acid by the Oral Flora
J. dent. Res. 45, 1824 (1966)
- M i s h i r o Y., M. M o r i t a , K. K i r i m u r a
Promoting Effect of Saliva Dialysate on the
Lactate Production of Streptococcus salivarius
Archs. oral Biol. 15, 465 (1970)
- M o f f a t E.D., R.I. L y t l e
Analyt. Chem. 31, 926 (1959)
zitiert nach Br nner, Niederwieser (1960)
- M o l a n P.C., R.L. H a r t l e s
The Identification of a Glycolysis-Enhancing
Factor in Human Parotid Saliva
Archs. oral Biol. 14, 421 (1969)
- M o l a n P.C., R.L. H a r t l e s
A Study of the Enhancement of Glycolysis in
Human Saliva
Archs. oral Biol. 17, 1671 (1972)
- M o o r J.R., D.R. G i l l i g a n
Paper Partition Chromatography of Free Amino
Acids and Peptides of Normal Human Saliva
J. Natl. Cancer Inst. 12, 691 (1951)
- M ¨ h l e m a n n , H.R.
Der Speichel
Schweiz. Med. Wschr. 85, 435 (1955)

P a p a n a y o t o u P.H., J. D o z i - V a s s i -
l i a d e s , A. K o v a t s i s

Free Amino Acids in Human Saliva
J. dent. Res. 52, 418 (1973)

P a t a k i G.

Revelation von Carbobenzoxym-Aminosäuren auf
Dünnschichtchromatogrammen
J. chromatog. 12, 541 (1963)

P a t a k i G.

Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure-
und Peptidchemie
Walter de Gruyter & Co., Berlin (1966)

S c h r a t z E., W. E g e l s

Fraktionierte, eindimensionale Papierchromatogra-
phie
Planta med. 6, 148 (1958)

S c h w a r t z D.P., J.T. S h e r m a n

Improved N-Chlorination Procedure for Detecting
Amides, Amines, and Related Compounds on Thin-
Layer-Chromatograms
J. chromatog. 240, 206 (1982)

S t a h l E.

Geräte und allgemeine Techniken der DC
In E. Stahl: Dünnschichtchromatographie -
Ein Laboratoriumshandbuch, 2. Auflage
Springer-Verlag, Berlin (1967)

U d e n f r i e n d S.

Fluorescence Assay in Biology and Medicine
Academic Press, New York (1962)

W a s d e l l M.R.

The Effect of Amino Acids and Related Compounds
on the Metabolism of Saliva
Archs. oral Biol. 7, 25 (1962)

W e r n i c k e R.

Fractogel TSK: Neue Träger für die hydrophile
Gelchromatographie

Kontakte (Merck) 1982/1, 3

W o l d r i n g M.G.

Free Amino Acids of Human Saliva; a Chromatographic Investigation

J. dent. Res. 34, 248 (1955)

Herrn Prof. Dr. A. Kröncke danke ich für die Überlassung des Themas sowie dafür, daß er mir die Durchführung der experimentellen Arbeiten im biochemischen Labor der Klinik und Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie ermöglichte. Mein besonderer Dank gilt ferner Dr. W. Distler für seine wertvollen Anregungen und die jederzeit bereitwillig gewährte Unterstützung, sowie Frä. U. Künzel, die mir bei den gelchromatographischen Versuchen tatkräftig zur Seite stand.

Lebenslauf

Geboren am 30. März 1958 in Nürnberg als erstes Kind des Betriebswirts Julius Pfannerer und seiner Ehefrau Rosa, geb. Konrad.

September 1964	Eintritt in die Volksschule Herzogenaurach
September 1968	Übertritt an das Marie-Therese-Gymnasium Erlangen
Juni 1977	Reifeprüfung
November 1977	Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
August 1978	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
April 1980	Zahnärztliche Vorprüfung
Januar 1983	Zahnärztliche Prüfung
4. Februar 1983	Bestallung als Zahnärztin
seit September 1983	Assistenz Zahnärztin bei Dr. H. Vogel, Hersbruck

